

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Psiquiatría



TESIS DOCTORAL

**Estudio de los posibles factores clínicos genéticos y
ambientales asociados con la respuesta al tratamiento con
acetato de glatirámico en pacientes con esclerosis múltiple**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Luis Ignacio Casanova Peño

Directores

**Rafael Arroyo González
Roberto Álvarez Lafuente**

Madrid, 2017

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Llevo mucho tiempo trabajando en esta tesis, y en muchas ocasiones me había imaginado en este momento de recordar a todo el mundo que supone algo importante para mí y que me ha ayudado a completar este trabajo. Y ahora que por fin estoy aquí sentado, escribiendo esta dedicatoria, y a punto de terminar, se ha convertido en un apartado igual de difícil o más que los demás.

En primer lugar me gustaría agradecer a los pacientes. Ellos son la principal razón de que hace ya muchos años decidiera que quería investigar, para buscar nuevas soluciones que ayudasen a combatir el dolor, en sentido amplio, de otros seres humanos.

En segundo lugar quiero agradecer a todo el equipo de enfermedades desmielinizantes y de las consultas de neurología. Algunos de estos compañeros, desafortunadamente, ahora trabajan en otros centros, pero para mí siempre serán parte de este equipo. Tengo que reconocer que soy una persona muy independiente y reservada, tanto que, en muchas ocasiones, guardo un pedacito de mí, como un secreto que casi nadie puede ver. Pues bien, desde el primer día que conocí a este grupo y empecé a trabajar con ellos (cuando todavía era residente) me sentí en “casa”. Desde el principio pude mostrarme tal y como soy. Y desde el principio recibí el máximo (cariño en lo personal y ayuda en lo profesional) de todas y cada una de estas grandísimas personas.

De mis compañeros neurólogos quiero agradecer especialmente a los residentes. Gracias a ellos, en muchas guardias, pude dedicar una parte importante del tiempo a ir haciendo poco a poco esta tesis. Además, ellos suponen una fuente de inspiración, de ilusión, de inocencia, de aprendizaje, etc, que resulta inconmensurable. Compartir con ellos 5 minutos de consultas o de una guardia produce una renovación inmediata de los principios e ilusiones propias.

En tercer lugar quiero agradecer a mis amigos. Mi mujer los llama los “mases”, porque siempre digo que para mi son “lo más”. Y es verdad. Tengo la gran fortuna de tener muchos amigos, y de recibir de su parte el mismo cariño que siento yo hacía ellos. Pero es más, tengo la gran fortuna de que sean ellos, porque no son unos amigos cualquiera, igual que no son unas personas cualquiera. Tengo el convencimiento, más allá de mi visión subjetiva, de que son unas personas especiales. Gracias Adriana, Alicia, Bárbara Nasarre, Barbara Otero, Carlos Tamarit, Gore, Mar Sacristán, Marta Bernardino, Marta Olmedilla, Martín Tamarit, Pablo Salinas, Victor Rodriguez, Victor Soto y Victor Piedrafita.

También quiero agradecer a mi familia, que me ha querido siempre con todas mis rarezas.

A mis padres, Tere y Juan, que son unos padres estupendos. Ahora empiezo a entender lo difícil que es ser padre. Para mi sois unos héroes y unos triunfadores.

A mi hermana Irene. Ella ha sido siempre una de esas pocas personas con las que me sentía “en casa”, y con las que no necesitaba ocultarme ni un milímetro. Siempre he tenido una conexión especial y una confianza única con ella. Gracias por todo Ire!

A mi tía Elena, que es la tía más feliz, más molona y más divertida que se puede tener.

A los peques de la casa. Mi hijo Álvaro. Todavía es muy pequeño y no se entera de casi nada. Pero cuando dice “hola”, que es la única palabra que dice por el momento, en realidad a mi me está relatando un tratado completo de cariño, y me obliga a esforzarme para ser la mejor persona que pueda llegar a ser. Y la pequeña Lucía. En el momento de escribir esta dedicatoria todavía no la tenemos entre nosotros, pero queda muy poco tiempo ya, así que aquí estará para animarme las noches previas a la presentación de la tesis.

Y por último a mi mujer Ana. Ella es otra persona única. Su sensibilidad es especial, y su psicología aguda y certera, con lo que todo lo adivina y siempre acierta. Desde el primer día que nos conocimos ya sabía cómo era yo. Y desde aquel mismo momento siempre fue otra persona con la que me sentía “en mi casa”: tranquilo, contento, a gusto, a salvo. Gracias a ella soy una persona más normal (porque me pone los pies en el suelo, al mismo tiempo que me sigue ayudando a volar), y siempre estoy feliz. Gracias por todo, Ana, te quiero.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A: Adenina.

Ag: Antígeno

AG: acetato de glatirámico.

APC: Células presentadoras de antígenos.

AUC: Área bajo la curva.

BAFF: Factor de activación de las células B de la familia del TNF-alfa.

BDNF: Factor de crecimiento derivado del cerebro.

BHE: Barrera hemato-encefálica.

BOC: Bandas oligoclonales.

Breg: Células B reguladoras.

C: Citidina.

E: Especificidad

EAE: Encefalitis alérgica experimental.

EDSS: Expanded Disability Status Scale.

EM: Esclerosis múltiple.

EM-PP: Esclerosis múltiple primaria – progresiva.

EM-PR: Esclerosis múltiple progresiva – recurrente.

EM-RR: Esclerosis múltiple recurrente – remitente.

EM-SP: Esclerosis múltiple secundariamente progresiva.

G: Guanina.

GWAS: Estudio de asociación de genoma completo.

HERV: Retrovirus endógenos humanos.

HHV-6: Virus herpes humano tipo 6.

HLA: Complejo de histocompatibilidad humana.

HSV-1: Virus herpes humano tipo 1.

IFN- β : Interferón beta.

IM: Intramuscular.

LCR: Líquido céfalo raquídeo.

LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva.

MAF: Alelo de frecuencia menor.

MBP: Proteína básica de la mielina.

MSRV: Multiple Sclerosis associated Retrovirus.

NF-K β : Factor de transcripción nuclear Kappa beta

NK: Células Natural Killer

NR: No respondedor.

OR: Odds Ratio

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PD: Progresión de la discapacidad.

R: Respondedor.

RM: Resonancia magnética

S: Sensibilidad

SC: Subcutáneo.

SCA: Síndrome clínico aislado.

SNC: Sistema nervioso central.

SNPs: Polimorfismo de nucleótido simple.

SSP-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa por primer de secuencia específica

T: Timina.

TAR: Tasa anualizada de brotes.

Treg: Células T reguladoras.

Th0: Células T-CD4 indiferenciadas.

Th1: Células T-CD4 pro-inflamatorias

Th2: Células T-CD4 anti-inflamatorias.

Thf: Células T foliculares.

Treg: Células T reguladoras.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TRAIL: ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF.

VCAM-1: Molécula de adhesión vascular tipo 1.

VEB: Virus Epstein-Barr.

VLA-4: antígeno-4 de activación muy tardío.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	10
2. ABSTRACT.....	17
3. INTRODUCCIÓN.....	23
3.1. Epidemiología.....	23
3.2. Etiopatogenia.....	25
3.2.1. Genética y Esclerosis múltiple.....	25
3.2.2. Factores ambientales.....	27
3.2.2.1. Virus y Esclerosis múltiple.....	28
3.2.2.2. Vitamina D, tabaco y obesidad.....	33
3.3. Clínica.....	35
3.4. Tratamiento.....	36
3.5. Marcadores de respuesta.....	38
3.5.1. Marcadores de respuesta del IFN β	39
3.5.2. Mecanismo de acción del acetato de glatirámero.....	42
3.5.3. Marcadores de respuesta al acetato de glatirámero.....	46
4. HIPÓTESIS.....	49
5. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	50
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
6.1. Diseño del estudio.....	51
6.2. Población del estudio.....	51
6.3. Definiciones.....	52
6.4. Recogida y procesamiento de las muestras.....	53

6.5. Extracción de ADN de PBMCs y suero.....	54
6.6. Determinación de los niveles de anticuerpos IgG e IgM anti-HHV-6.....	55
6.7. Genotipado HLA.....	55
6.8. Genotipado alelo DRB1*15:01.....	56
6.9. Genotipado SNPs-GWAS.....	57
6.10. Análisis de la asociación entre la serología frente al HHV-6 y la respuesta al acetato de glatirámero.....	57
6.11. Análisis de la asociación del HLA-II con la respuesta al acetato de glatirámero...	58
6.12. Análisis de la asociación de SNPs-GWAS con la respuesta al acetato de glatirámero.....	58
6.13. Análisis de las interacciones entre los alelos HLA, SNPs-GWAS y HHV-6 sobre la respuesta al acetato de glatirámero.....	66
6.14. Análisis estadístico.....	66
7. RESULTADOS.....	69
7.1. Análisis de la efectividad y tolerabilidad del tratamiento con acetato de glatirámero en pacientes con esclerosis múltiple recurrente en condiciones de práctica clínica habitual.....	69
7.2. Análisis de la asociación de los factores clínicos (sexo, edad de inicio, tipo de tratamiento previo, EDSS basal y número de brotes en los 2 años anteriores al inicio del tratamiento) con la respuesta al acetato de glatirámero.....	79
7.3. Análisis de la asociación del HHV-6 con la respuesta al acetato de glatirámero....	84
7.4. Análisis de la asociación de las variantes alélicas del HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1 con la respuesta al acetato de glatirámero.....	89
7.5. Análisis de la asociación de SNPs -GWAS con la respuesta al acetato de glatirámero.....	95

7.6. Análisis de las interacciones entre los alelos HLA, SNP-GWAS y HHV-6 sobre la respuesta al acetato de glatirámero.....	104
8. DISCUSIÓN.....	110
8.1. Análisis de la efectividad y tolerabilidad del tratamiento con acetato de glatirámero en pacientes con esclerosis múltiple recurrente en condiciones de práctica clínica habitual.....	110
8.2. Análisis de la asociación de los factores clínicos (sexo, edad de inicio, tipo de tratamiento previo, EDSS basal y número de brotes en los 2 años anteriores al inicio del tratamiento) con la respuesta al acetato de glatirámero.....	117
8.3. Análisis de la asociación del HHV-6 con la respuesta al acetato de glatirámero...	120
8.4. Análisis de la asociación de las variantes alélicas del HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1 con la respuesta al acetato de glatirámero.....	124
8.5. Análisis de la asociación de SNPs-GWAS con la respuesta al acetato de glatirámero.....	128
8.6. Análisis de las interacciones entre los alelos HLA, SNPs-GWAS y HHV-6 sobre la respuesta al acetato de glatirámero.....	133
9. CONCLUSIONES.....	136
BIBLIOGRAFÍA.....	138
ANEXO I. SNPs-GWAS asociados con la respuesta al acetato de glatirámero.....	173
ANEXO II. SNPs-GWAS con tendencia a la asociación con la respuesta al acetato de glatirámero.....	178
ANEXO III. SNPs-GWAS no asociados con la respuesta al acetato de glatirámero.....	181

1. RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante y neurodegenerativa de la mielina y el axón del sistema nervioso central, que afecta a un elevado número de pacientes en los países occidentales siendo la segunda causa de discapacidad en los adultos jóvenes de estas poblaciones.

Sus causas no se conocen de forma completa en la actualidad, pero se acepta que la enfermedad tiene un origen multifactorial, en el que participan por un lado factores ambientales y factores genéticos de susceptibilidad, y por otro una respuesta autoinmune inflamatoria contra esta mielina del sistema nervioso central y mecanismos degenerativos.

La combinación de estos mecanismos fisiopatológicos genera 4 tipos clínicos de EM: la forma recurrente-remitente (EM-RR), secundariamente-progresiva (EM-SP), primariamente-progresiva (EM-PP), y primaria-recurrente (EM-PR).

Actualmente existen varios tratamientos que han demostrado eficacia controlando el componente inflamatorio de la enfermedad, y por lo tanto disminuyendo la probabilidad de aparición de nuevos brotes. En concreto, en este momento en Europa, están aprobados varios tratamientos para las formas clínicas de EM-RR (IFN beta 1b (Betaferon ®, Extavia ®), IFN beta 1 a (Avonex ®, Rebif ®), acetato de glatirámico (Copaxone ®), mitoxantrona (Novantrone ®), natalizumab (Tysabri ®), fingolimod (Gilenya ®), teriflunomida (Aubagio ®), BG-12 (Tecfidera ®) y alemtuzumab (Lemtrada ®), y para los tipos de EM-SP (Betaferon ® , Extavia ®, Rebif ® y Novantrone ®).

Este número se prevé que se incremente en los próximos años con varios tratamientos que están en las fases finales de investigación clínica (daclizumab, ocrelizumab, laquinimod, siponimod) y otras numerosas terapias en fases más iniciales.

La eficacia obtenida en los ensayos clínicos que condujeron a la comercialización de todos estos tratamientos solo aporta datos estadísticos globales de dicha eficacia. Así, en concreto, Betaferon ®, Extavia ®, Avonex ®, Rebif ®, Copaxone ® y Aubagio ®, obtienen datos de reducción de la tasa de brotes semejantes en torno al 30-35% en los estudios pivotaes. En los casos de fracaso de estas terapias, o bien, en formas clínicas de EM-RR con inicio agresivo de la enfermedad, está aprobado el uso de fármacos más potentes, pero que pueden ocasionar efectos secundarios potencialmente más complejos.

Dentro de estos datos globales de eficacia, existe una gran variabilidad en la respuesta terapéutica de cada paciente, por lo que la selección precoz de los mejores candidatos a cada terapia sería ideal para mejorar el tratamiento de esta enfermedad y minimizar las posibles reacciones adversas.

Nuestra hipótesis es que la variabilidad de la respuesta de cada uno de estos tratamientos en cada paciente concreto debe responder a factores individuales, que podrían ser clínicos, ambientales y/o genéticos.

Los objetivos del presente trabajo son analizar la efectividad clínica y efectos secundarios del tratamiento con acetato de glatirámico (AG) en pacientes con esclerosis múltiple en condiciones de práctica clínica habitual, y analizar la asociación del grado de respuesta terapéutica del acetato de glatirámico con variables clínicas, factores ambientales (modificación de los títulos de anticuerpos IgG e IgM frente al virus HHV-6), y datos genéticos (HLA-II y SNPs de genes asociados con el riesgo de padecer EM descritos en uno de los últimos GWAS (SNPs-GWAS)).

El estudio se realizó mediante un diseño de cohortes observacional retrospectivo por revisión de las historias clínicas de los pacientes con EM atendidos en la unidad de Enfermedades desmielinizantes del Hospital clínico San Carlos de Madrid, que llevaran al menos 2 años de tratamiento con AG o lo hubieran suspendido antes del 2º año por fracaso terapéutico.

Se obtuvieron muestras de sangre para la determinación de las cifras de anticuerpos IgG e IgM anti-HHV6 al inicio del tratamiento y cada 6 meses, y para el análisis genético de las variantes del HLA-DR, HLA-DQA y HLA-DQB, y de 42 SNPs-GWAS, de todos los pacientes posibles.

Se definió brote como cualquier síntoma neurológico focal nuevo, o empeoramiento de uno antiguo, de más de 24 horas de duración, separado de cualquier otro síntoma neurológico focal un mínimo de 30 días, y sin la coexistencia de fiebre, infecciones o cualquier otro desencadenante sistémico.

Se definió progresión de la discapacidad (PD) como el aumento de 1 punto o más en los pacientes con EDSS basales entre 1 y 5,0; aumento de 1,5 puntos o más en pacientes con EDSS basal de 0; y aumento de 0,5 puntos o más en sujetos con EDSS de inicio de 5,5 o superior.

Se definió fracaso terapéutico del AG en pacientes con 2 o más brotes y/o PD durante los dos años del estudio. Aquellos pacientes que no cumplieron los dos años de seguimiento y fueron cambiados de fármaco según criterio médico por aparición de brotes y/o aumento de la EDSS también fueron considerados como fallo del tratamiento.

Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el software IBM © SPSS statistics ®, versión 19 para Windows.

Un total de 250 pacientes fueron incluidos: 204 EM-RR y 46 EM-SP. Un 66% (165) eran mujeres y 34% (85) hombres. La edad media de inicio de la enfermedad fue 31,1 años, y la edad media de inicio del AG de 36,9.

La tasa anualizada de brotes (TAR) de la muestra global durante los dos años anteriores al inicio del estudio era de 0,98, algo mayor en las formas clínicas EM-RR (1,1) que en los sujetos EM-SP (0,6).

La EDSS basal de la muestra global era de 2,4, siendo esta cifra menor en los pacientes EM-RR (1,8), que en los sujetos EM-SP (4,9).

En cuanto a los datos de eficacia, el AG redujo la TAR tras el primer año de tratamiento en un 49,6%. Por otro lado, la EDSS se mantuvo estable, sin cambios estadísticamente significativos tras los dos años de tratamiento.

Combinando ambos datos, 160 pacientes (64,3%) cumplieron los criterios de respondedores (IC 95%: 58-70%). Dicha respuesta fue algo mayor en las formas EM-RR (67,5%) que en los pacientes EM-SP (50%), aunque esta diferencia no alcanzaba la significación estadística.

El AG mostró un elevado perfil de seguridad. Solo 6 de los 287 pacientes iniciales (1,7%) presentaron efectos secundarios que obligaron a la suspensión del fármaco. Por otra parte, de los 250 pacientes finales incluidos en el estudio hasta un 95,2% se mantuvieron libres de reacciones adversas. Y en los 12 pacientes restantes que registraron algún efecto secundario, estos fueron leves-moderados y bien tolerados.

Respecto al valor predictivo de las variables clínicas se encontró que la forma clínica y el número total de brotes en los dos años anteriores al inicio del AG estaban asociados estadísticamente con la respuesta terapéutica al AG. En concreto, los pacientes EM-SP

tenían 2,81 veces más riesgo de fracaso del tratamiento que los pacientes EM-RR (IC 95% 1,4 – 5,6). Igualmente, cada brote durante los dos años anteriores al inicio del AG multiplicaba el riesgo de fracaso terapéutico por 1,34 (IC 95%: 1,1 – 1,6).

Los datos serológicos del cambio de las cifras de anticuerpos IgG frente al HHV-6 también se encontraron asociados con la respuesta terapéutica al AG. Si categorizamos la disminución porcentual de estas cifras de IgG anti-HHV6 en 5 grupos (1: no disminución ó aumento de la IgG; 2: disminución menor del 5% respecto el valor basal de la IgG; 3: disminución mayor del 5% pero menor del 10%; 4: disminución mayor del 10% pero menor del 20%; y 5: disminución mayor del 20%) se halló que el paso de un grupo a otro con mayor reducción de las IgG multiplicaba las opciones de respuesta terapéutica al AG por 1,51 (IC 95%: 1,07 – 2,12).

En cuanto al complejo de histocompatibilidad humana (HLA), se encontró un efecto beneficioso del HLA-DR11. La presencia de al menos 1 copia de este alelo aumentaba la probabilidad de respuesta terapéutica al AG por 5,6 veces (IC 95%: 1,26 – 24,9).

Finalmente, el estudio genético con los SNPs-GWAS también encontró 9 SNP's asociados estadísticamente con la respuesta terapéutica al AG. Estos eran:

- 1) rs11810217. Gen EVI5. Oncogen relacionado con la regulación de la mitosis.
- 2) rs12212193. Gen BACH2. Participa en mecanismos de regulación de las células B. producción de linfocitos T reguladores y disminución de células efectoras Th1, Th2 y Th17.
- 3) rs12466022. Gen no conocido.
- 4) rs140522. Gen SCO2. Proteína de ensamblaje de la citocromo C oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial.

- 5) rs17066096. Gen IL22RA2. Codifica para la síntesis de una proteína soluble que se une al receptor de la IL-22 impidiendo la unión de esta citocina y bloqueando sus acciones inflamatorias.
- 6) rs2303759. Gen CD37. Parece intervenir en la transducción de diferentes funciones celulares y en las interacciones entre las células T y B.
- 7) rs7238078. Gen MALT1. Paracaspasa esencial en la activación de los linfocitos T y, en menor medida, de los linfocitos B, a través del factor de transcripción Nuclear Factor Kappa Beta (NF- κ B).
- 8) rs7522462. Gen KIF21B. Relacionado con el transporte axonal, por lo que se especula que podría tener un papel en el mecanismo degenerativo de la EM.
- 9) rs7595037. Gen PLEK. Codifica la proteína Pleckstrin, uno de los principales sustratos de la protein-kinasa C de las plaquetas. Se piensa que podría actuar regulando diferentes funciones celulares, como por ejemplo agregación plaquetaria y coagulación, organización del citoesqueleto, diferenciación de células hematopoyéticas, señalización y tráfico celular, entre otras, aunque se desconoce cuál podría ser su relación con el mecanismo de acción de la Esclerosis múltiple.

Además de estos 9 SNP's había otros 5 que, aunque no alcanzaban la significación estadística, mostraban una tendencia con esta asociación. Estos SNP's eran:

- 1) rs10466829. Gen CLECL1. Molécula co-estimuladora de los linfocitos T. Favorece las respuestas Th2 y la producción de IL-4.
- 2) rs13333054. Gen IRF8. Factor de transcripción de la familia de factores reguladores de los IFN de tipo I y genes del HLA-I inducibles por IFN.

- 3) rs2019960. Gen PVT1. Oncogen alterado en diferentes tumores, principalmente neuroblastoma y procesos linfoproliferativos.
- 4) rs2248359. Gen CYP24A1. Proteína de la familia del citocromo P450 que participa en la degradación de la vitamina D activa.
- 5) rs802734. Gen THEMIS. Controla la correcta maduración y selección de los linfocitos T.

Conclusiones

Los resultados obtenidos, permitirían concluir que el AG sería un fármaco efectivo y bien tolerado para el tratamiento de los pacientes con EM-RR y, en menor medida, en pacientes con EM-SP.

Se obtuvieron varios marcadores clínicos (número de brotes en los 2 años anteriores al inicio del tratamiento y tipo de forma clínica de EM), serológicos (reducción de las cifras de Anticuerpos IgG anti-HHV6) y genéticos (HLA-DR11 y varios SNP's) asociados con el grado de respuesta al AG, y que podrían servir como datos útiles en la práctica clínica habitual para mejorar el tratamiento de la EM.

2. ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating and neurodegenerative disease of the central nervous system that affects a high number of patients in the western world and represents the second cause of disability in young people of these countries.

Its causes are not completely understood, but it is accepted that it has a multifactorial origin, with environmental and genetic factors playing a role and then autoimmune and neurodegenerative mechanisms against the myelin sheath.

The combination of these pathogenic mechanisms gives 4 different clinical phenotypes of the disease: the relapsing – remitting multiple sclerosis (RR-MS), the secondary – progressive MS (SP-MS), the primary progressive MS (PP-MS) and the primary – recurrent MS (PR-MS).

Currently there are some treatments that have demonstrated efficacy for the inflammatory component of the MS, and thus reducing the risk of new relapses. In fact, in this moment in Europe, there are several drugs approved for the treatment of RR-MS (IFN beta 1b (Betaferon ®, Extavia ®), IFN beta 1a (Avonex ®, Rebif ®), glatiramer acetate (Copaxon ®), mitoxantrone (Novantrone ®), natalizumab (Tysabri ®), fingolimod (Gilenya ®), teriflunomide (Aubagio ®), BG-12 (Tecfidera ®), and alemtuzumab (Lemtrada ®); and for the SP-MS (Betaferon ®, Extavia ®, Rebif ® and Novantrone ®).

These options are likely going to increase in the near future with several drugs in the last phases of clinical investigation (daclizumab, ocrelizumab, laquinimod, siponimod), and many more in the pipeline.

The efficacy of these treatments in the clinical trials that led to their commercialization only inform about global and statistical results. In this regard, Betaferon ®, Avonex ®,

Rebif ®, Copaxon ® and and Aubagio ® get the same relapse rate reduction of around 30-35% in their pivotal trials. In cases of treatment failure of these drugs, or in situations with an aggressive onset of the disease it is approved the use of more potent therapies, which, on the other hand, are associated with more dangerous side effects.

But these global efficacy data is highly variable between different individuals. For this reason the early and correct selection of the best therapy for each patient would be the perfect solution to optimize the outcome of the patients, and minimize the possible side effects.

Our hypothesis is that this variability found with these treatments within each patient could be related to individual factors such as clinical characteristics, environmental factors and genetic data.

The objectives of the present study were to analyze the clinical effectivity and adverse events with glatiramer acetate (Copaxone ®) in patients with MS in a day a day clinical routine, and to evaluate the association between the response to this treatment with clinical characteristics, environmental factors (modification of the IgG and IgM antibodies titers against the Human Herpes Virus 6 (HHV-6)), and genetic data (HLA-II genes, and single nucleotid polymorphisms (SNPs) of genes associated with the risk to develop MS described in a recent GWAS (GWAS-SNPs)).

We designed a retrospective and observational study with review of the medical records of the patients diagnosed with MS attending the demyelinating diseases unit at Hospital Clinico San Carlos, Madrid. Inclusion criteria: patients treated with glatiramer acetate (GA) for at least 2 years, or who had suspended GA due to early treatment failure.

We obtained serological samples for the analysis of IgG-HHV6 and IgM-HHV6 before the initiation of GA, and every 6 months thereafter, and blood samples for the determination of the HLA-DR, HLA-DQA, HLA-DQB, and GWAS-SNPs of 42 genes.

We defined relapse as any new or worsening of previous focal symptoms that lasted more than 24 hours, and separated for any other neurological focal symptom for more than 30 days, in the absence of fever, infectious diseases or any other systemic situation.

We defined progression of disability (PD) as an increase of the EDSS of at least 1 point in patients with a baseline EDSS between 1 to 5; an increase of 1.5 in patients with a baseline EDSS of 0; and an increase of at least 0,5 points in patients with baseline EDSS of 5,5 or higher.

We defined treatment failure to GA (TF) as having 2 or more relapses and/or PD during the 2 years of the study. Those patients that did not complete the 2 years of follow-up due to physician criteria, either for clinical relapses or increase in the EDSS were also classified as TF.

Statistical analysis was done with the 19 version of IBM © SPSS Statistics ® for windows.

250 patients were included: 204 RR-MS and 46 SP-MS. 66% (165) were women and 34% (85) men. The mean age of onset of MS was 31.1, and the mean age of onset of GA was 36.9 years-old.

The annualized relapse rate (ARR) of the global sample of patients during the 2 years previous to the initiation of GA was 0.98, slightly higher in RR-MS patients (1.1) compared to SP-MS (0.6).

Baseline EDSS was 2.4, slightly lower in RR-MS (1.8) than in SP-MS (4.9).

Regarding the efficacy data, GA decreased the ARR after the first year of treatment up to 49.6%. In the same way, the EDSS remained stable over the 2 years of the study.

Taking together these two data, 160 patients (64.3%) were classified as responders (IC 95% 58-70%). This efficacy was a bit higher in RR-MS (67.5%) than in SP-MS patients (50%), although this difference was not statistically significant.

GA showed a good security profile. Only 6 of the 287 initial patients (1.7%) had to stop the treatment due to adverse effects. In the same way, up to 95.2% of the 250 finally included patients were free of any side effects. The adverse reactions in the remaining 12 patients were mild and well tolerated.

Regarding the prognostic value of the clinical characteristics analyzed, we found that the clinical type of MS and the total number of relapses in the 2 years before the onset the study were statistically associated with the response to GA. SP-MS patients had 2.81 more risk of TF than RR-MS (IC 95% 1.4 – 5.6). Each relapse multiplied the risk of TF for 1.34 (IC 95% 1.1 – 1.6).

The change in the titers of IgG-HHV6 was also statistically associated with the clinical response to GA. If we divide the percentage reduction of IgG-HHV6 in 5 groups (1: no reduction or increase; 2: reduction less than 5%; 3: reduction higher than 5% but less than 10%; 4: reduction higher than 10% but less than 20%; and 5: reduction of more than 20%), we found that going from one group to another with higher reduction, multiplied the probability of response to GA in 1.51 (IC 95% 1.07 – 2.12).

Regarding the HLA, we found a positive effect for the HLA-DR11 allele. The presence of at least one copy of this gene increased the likelihood of clinical response in 5.6 folds (IC 95%: 1.26 – 24.9).

Finally, the study of GWAS-SNPs, resulted in the discovery of 9 SNP statistically associated with the response to GA. These SNP's are:

- 1) rs11810217. Gene EVI5. Oncogen related with the regulation of mytosis.
- 2) rs12212193. Gene BACH2. It is implicated in regulation mechanisms of B cells, production of regulator T lymphocytes (Treg) and a decrease in effector Th1, Th2 and Th17 cells.
- 3) rs12466022. Unknown gene.
- 4) rs140522. Gene SCO2. Protein of the Cytochrom C oxidase in the mitochondrial respiratory chain.
- 5) rs17066096. Gene IL22RA2. This gene codifies for a soluble protein that acts as antagonist of the interleukin IL-22, blocking its inflammatory reactions.
- 6) rs2303759. Gene CD37. It seems related with the transduction of several cellular functions, and the interactions between T and B cells.
- 7) rs7238078. Gene MALT1. Paracaspase. It is essential for the activation of T lymphocytes, and to a lesser extent, of B lymphocytes, through the transcription factor Nuclear Factor Kappa Beta (NF- κ B).
- 8) rs7522462. Gene KIF21B. Related with axonal transport. In this regard it is speculated that it could play a role in the neurodegenerative mechanism of MS.
- 9) rs7595037. Gene PLEK. This gene codifies for the protein Pleckstrin C in the platelets. In this moment, the relationship between this protein and the pathogenic mechanism of MS is not fully understood. It is thought that it could work regulating many different cellular functions, such as clot formation,

coagulation, citoesquelet organization, differentiation of hematopoyetic cells, signaling and cellular trafficking.

Beside these 9 SNP's, we found 5 additional SNP's with a trend to the statistical association. These were:

- 1) rs10466829. Gene CLECL1. Co-stimulatory molecule for the T-cells. It drives the responses Th2 and increases the synthesis of IL-4.
- 2) rs13333054. Gene IRF8. Transcription factor of the family of regulating factors of IFN type I and genes HLA-I controlled by IFN.
- 3) rs2019960. Gene PVT1. Oncogen. It is altered in some neoplasms, mainly neuroblastoma and lymphoproliferative tumors.
- 4) rs2248359. Gene CYP24A1. Cytocrome P450 protein, that is part of the degradation mechanism of the active vitamin D.
- 5) rs802734. Gene THEMIS. It works regulating the normal maturation and selection of T cells.

Conclusions

With the previous results we could conclude that GA is an effective and a well tolerated drug for the treatment of RR-MS and, to a less extent, SP-MS patients.

We found clinical markers (number of relapses in the 2 years before the onset of GA and clinical type of MS), serological markers (reduction of the titers of IgG-HHV6) and genetic markers (HLA-DR11 and some SNP's) associated with the clinical response to GA. These markers could be used in the routine clinical practice to improve the treatment of the patients with MS.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Epidemiología

La esclerosis múltiple (EM) es una de las enfermedades neurológicas más frecuentes entre los adultos jóvenes en los países occidentales y una de las principales causas de discapacidad en este grupo de edad (1–3).

En los primeros estudios epidemiológicos de Kurtzke (4–7), se describían tres zonas con diferentes riesgos en relación con la localización geográfica, con prevalencias que variaban desde cifras de más de 30 casos/100.000 habitantes (riesgo alto, en el norte de Europa, norte de Estados Unidos y Canadá), entre 5 y 30 casos/100.000 habitantes (riesgo medio, en Australia, y el sur de Europa y de Estados Unidos) y menos de 5 casos/100.000 (riesgo bajo en África, Asia, y América central y Sudamérica).

Desde aquellos trabajos iniciales se han realizado numerosos estudios, en los cuales se ha observado un claro aumento de las tasas de incidencia y prevalencia durante los últimos 20-30 años en todas las regiones analizadas (8–14).

Además, estas investigaciones han puesto también de manifiesto una disminución del efecto de la latitud sobre el riesgo de padecer EM (9,15,16), que aunque se sigue aceptando en general (17), se han demostrado excepciones llamativas, como el riesgo especialmente alto en Sicilia y Cerdeña (18–21), y las cifras bajas de regiones nórdicas de los países escandinavos (22). (Figura 1).



Figura 1. Distribución mundial de la esclerosis múltiple (Octubre/2013). (23).

Los últimos trabajos realizados en España confirman los datos previos, con cifras de prevalencia entre 40-80 casos/100.000 habitantes, e incidencias entre 2,6 y 5,3 casos/100.000 habitantes (24–34), e incluso valores mayores, cercanos a 100 afectados/100.000 habitantes, en estudios aún no publicados. Estos datos sitúan a nuestro país dentro del grupo de riesgo intermedio-alto, semejante a otros países europeos. (Figura 2).

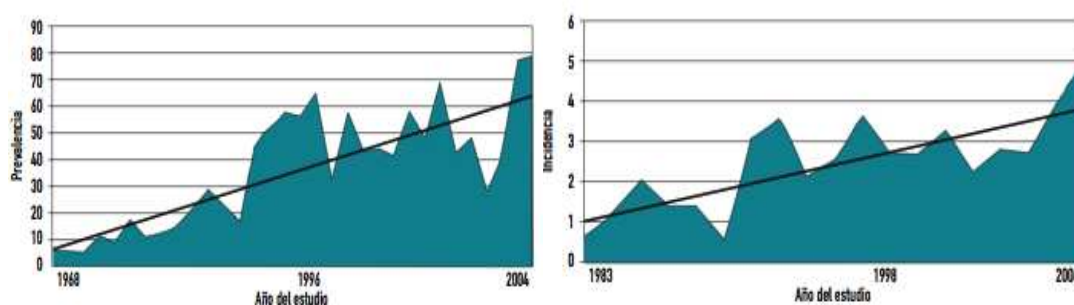


Figura 2. Evolución de las cifras de prevalencia e incidencia en España. (35)

3.2. Etiopatogenia

La fisiopatología de la EM no es del todo conocida pero se acepta que se trata de un trastorno de etiología disimmune, en el que participan mecanismos de autoinmunidad, inflamación y degeneración, y con un origen multifactorial entre los que destacan los factores genéticos y ciertos factores ambientales (36). (Figura 3).

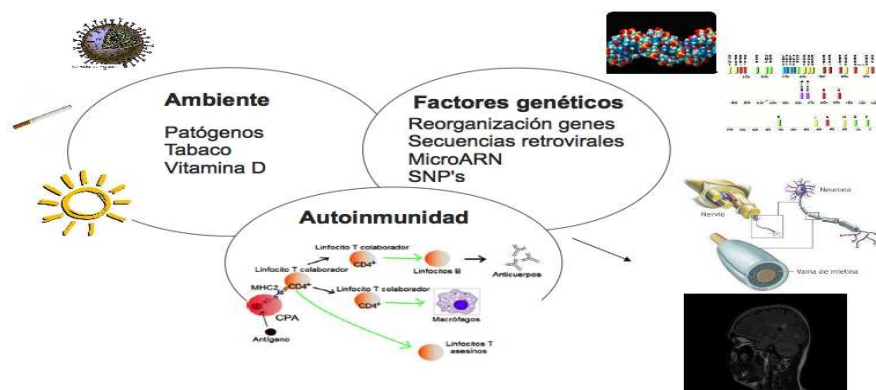


Figura 3. Etiopatogenia multifactorial de la esclerosis múltiple.

3.2.1. Genética y Esclerosis múltiple

A nivel genético destaca el complejo de histocompatibilidad humana (HLA), que podría explicar alrededor del 20% de la susceptibilidad genética a padecer EM. Dicha asociación empezó a conocerse desde los primeros estudios serológicos de la década de 1970 (37).

Durante los últimos años, los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han permitido refinar y ampliar dicha asociación. Actualmente están claramente definidos

cuatro alelos de dos loci del complejo HLA relacionados con el riesgo de desarrollar EM (38). Estos son el HLA-DRB1*15:01, que supone la asociación más fuerte, aumentando cada copia de este gen 3 veces el riesgo de EM; HLA-DRB1*03:01; HLA-DRB1*13:03; y HLA-A-*02:01, que confiere un efecto protector. Junto a los anteriores, se han descrito otros alelos con asociaciones no completamente confirmadas en la actualidad, como son los alelos de riesgo HLA-DRB1*03:01 y HLA-DRB1*08:01, y los alelos protectores HLA-A*68:01, *02:05 y 02:06 (38,39).

Igualmente, los avances tecnológicos y los últimos y extensos GWAS de los últimos años han permitido descubrir otros genes. Actualmente existen 103 variantes de tipo polimorfismo de nucleótido simple (SNPs) situados fuera del sistema HLA, con un incremento del riesgo más modesto de entre 1,08 y 1,22 veces (38,40,41), y que junto con el HLA explicarían el 25% de la carga genética de la EM (42).

Estos SNPs están localizados en genes implicados en todos los posibles mecanismos patogénicos de la EM, como son el desarrollo de la inmunidad (citoquinas, moléculas co-estimuladoras,...), factores ambientales (genes del metabolismo de la vitamina D), y neurodegeneración. No obstante, de todos ellos, hasta un 80% están relacionados con la regulación de la respuesta inmune, y más de un 30% de los SNP's se correlacionan a su vez con el riesgo de otras enfermedades autoinmunes, lo que indica la gran importancia del mecanismo disimmune en el desarrollo de la EM (38,41).

3.2.2. Factores ambientales

A pesar de estos componentes genéticos, existen también claras variaciones geográficas en la epidemiología de la EM que no pueden ser explicadas únicamente por dicho mecanismo genético, y que apoyan fuertemente la influencia de factores ambientales en el desarrollo de esta enfermedad. Ejemplos de estas variaciones geográficas son el efecto del gradiente de la latitud (7,43), o los cambios del riesgo de padecer EM entre sujetos con un mismo origen étnico que migran a zonas de diferente prevalencia (44–46).

Dentro de estos factores ambientales, aquellos para los que, hasta el momento, se han encontrado un mayor número de evidencias que sugieren su posible relación con el riesgo de padecer EM son la vitamina D (47–51), el hábito tabáquico (52–54), y los virus Epstein-Barr (VEB), virus herpes humano tipo 6 (HHV-6), y algunos retrovirus endógenos humanos (HERV) (55–57).

Además, en los últimos años, se están postulando otros factores ambientales posiblemente relacionados con el riesgo de desarrollar esta enfermedad, como son el consumo de sal, (58–60) y el índice de masa corporal aumentado durante la infancia y la adolescencia (61,62).

Todos estos factores ambientales, podrían explicar también, al menos en parte, el aumento que ha experimentado la incidencia y prevalencia de la Esclerosis múltiple en los países occidentales durante las últimas décadas (63,64).

3.2.2.1. Virus y Esclerosis múltiple

El más estudiado es el VEB, y su asociación con la EM parece robusta, como corroboran numerosos estudios epidemiológicos y de laboratorio, aunque se desconoce si esta asociación podría ser causativa o simplemente un desencadenante no específico de la cascada autoinmune.

Para empezar, está ampliamente descrita la mayor seroprevalencia de VEB en los pacientes con EM (80-99%) frente a los sujetos sanos (40-90%) (65–69). Más allá de dichos estudios serológicos se ha comprobado también que este riesgo de padecer EM no solo es menor en los sujetos sin anticuerpos frente al VEB que en los pacientes seropositivos, sino que también se incrementa en los sujetos que contraen el VEB en la edad adulta y por lo tanto desarrollan la mononucleosis infecciosa frente a aquellos que se contagian en la infancia y no desarrollan la infección clínica (68). (Figura 4).

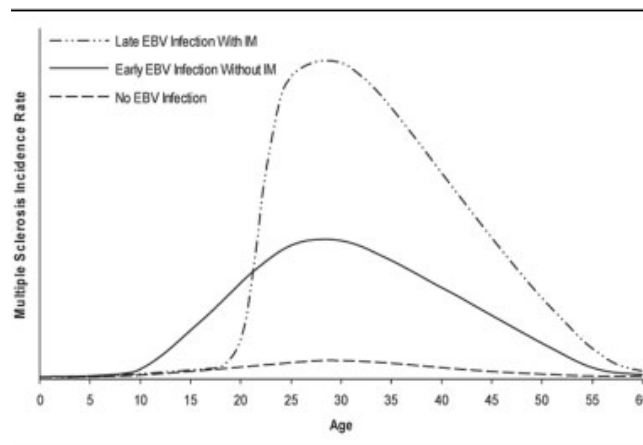


Figura 4. Incidencia de la EM según la infección del VEB. (70).

Por último, dentro de los datos que implican al VEB en la etiopatogenia de la EM, se ha descrito una relación entre la existencia de las recaídas de esta enfermedad con la replicación activa del virus (71), la presencia de células T y anticuerpos autoreactivos frente la mielina y el VEB (72,73), y la identificación de 2 péptidos del VEB como dianas de la respuesta inmune en el líquido-cefalorraquídeo de los pacientes con EM (74).

Respecto al HHV-6 también existen numerosas evidencias de su relación con la EM. Se trata de un virus con una alta seroprevalencia en la población, presente en casi todos los sujetos a partir de los dos años de edad (75), con tropismo por células del sistema nervioso central y del sistema inmunitario, y, que tras la primoinfección puede quedar latente, con reactivaciones periódicas a lo largo de la vida.

Se han descrito dos variantes. El HHV-6B, causante del exantema súbito de la infancia (76), aunque también existen casos publicados de manifestaciones neurológicas, como por ejemplo encefalitis (77). Y el HHV-6A, la variante más neurotrópica y que ha sido más frecuentemente relacionada con la EM.

Se ha señalado un posible aumento de la muerte de oligodendrocitos (78), y una disminución de la proliferación celular (79) mediada por este virus.

También se ha sugerido un posible efecto desmielinizante por reacción cruzada contra la mielina por mimetismo molecular. En este sentido se ha descrito una secuencia idéntica entre los aminoácidos 96-102 de la MBP y las posiciones 4-10 de la proteína U24 del HHV-6 (80,81).

Por otra parte, se ha postulado una posible relación entre esta proteína U24 y la patogenia de la EM a través de otro mecanismo. Se ha comprobado que la MBP de los

pacientes con EM contiene niveles de fosforilación en el residuo de Treonina-97 más bajos que en los sujetos sanos. Aunque no se conoce el significado de dicha fosforilación, se piensa que podría estar relacionada con el funcionamiento normal de la MBP. La proteína U24 puede ser fosforilada en el aminoácido equivalente de Treonina, lo que podría disminuir la fosforilación de la MBP y repercutir así en sus acciones normales, desencadenándose de esta manera el proceso patológico (82).

Por último, también se han sugerido posibles interacciones con el sistema inmune, tras describirse que el HHV-6 puede infectar células dendríticas inmaduras produciendo en ellas alteraciones fenotípicas y funcionales (83).

A nivel de laboratorio, existen más datos que refuerzan estas teorías. En primer lugar se ha detectado ADN del HHV-6 en las placas de desmielinización y en la sustancia blanca aparentemente normal de los sujetos con EM (84–86), en líquido céfalo-raquídeo de pacientes con EM, en oligodendrocitos, linfocitos y microglía de tejidos lesionados (87–90), y replicación activa viral mediante detección de RNA (85). Aunque estos resultados no han sido reproducidos en todos los estudios (91,92).

También se ha descrito una relación entre los títulos de anticuerpos (93–95) y la replicación activa del virus (89,96) con las recaídas de la enfermedad.

Por último, también se ha relacionado, al menos parcialmente, la respuesta terapéutica al IFN- β con su poder antiviral y la disminución de la replicación activa del HHV-6. Se ha encontrado que el tratamiento con IFN- β reduce la carga viral durante las recaídas de

la enfermedad, aunque no durante las fases de remisión (97,98), y que la persistencia del HHV-6 en sangre se asocia a un mayor riesgo de ausencia de respuesta al IFN- β (99).

Incluso se ha descrito una interacción entre el HHV-6 y SNPs en los locus del gen MHC2TA y CD46 con la respuesta terapéutica al IFN- β y la presencia de brotes, lo que explicaría interrelaciones entre los factores ambientales y genéticos (100,101).

Estas asociaciones se encuentran sobre todo en la fase remitente – recurrente de la EM, y no durante las fases progresivas, lo que podría justificar al menos en parte la falta de efectividad de este tratamiento en estas formas clínicas (102).

Los últimos agentes virales en incluirse dentro de los posibles participantes de la etiopatogenia de la EM han sido los retrovirus endógenos humanos (HERV), tras el hallazgo en 1989 de partículas retrovirales en cultivos de células leptomeníngeas y monocitos de pacientes con EM (103,104).

Posteriormente se han descrito varias familias de estos virus. Representan entre el 5 y el 8% del genoma, y en general son regiones de ADN inactivas. Sin embargo, algunas copias sí tienen capacidad codificante.

Se ha señalado que varias de estas secuencias parecen ser específicamente activadas en pacientes con EM, produciéndose diversos péptidos e incluso viriones completos, que pueden participar en el mecanismo etiopatogénico de la EM.

En concreto, el alelo 18.3 del HERV-K ha sido asociado con el riesgo a desarrollar EM (105), y títulos más altos de ARN y proteínas del virus HERV-H/F se han encontrado en pacientes con EM en comparación con controles sanos (106).

Pero el retrovirus más estudiado es el HERV-W. Dentro de esta familia destaca el MSRV (Multiple Sclerosis associated Retrovirus), y su proteína de cubierta *env* (envelope).

A nivel epidemiológico varios estudios han puesto de manifiesto dicha asociación. Se han encontrado partículas de estos virus en muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo y biopsias de pacientes con EM (107,108).

A nivel teórico, otros estudios han demostrado acciones neurotóxicas contra los oligodendrocitos (109), y activación de respuestas inmunitarias innatas y de células T (110).

Por otra parte, igual que ocurría con los VEB y HHV-6, los HERV no solo se han asociado con la susceptibilidad a padecer EM sino con un posible peor pronóstico de su evolución. Se ha hallado un mayor riesgo de recaídas, puntuaciones superiores en la escala EDSS y mayores porcentajes de conversión a formas clínicas con curso progresivo. (111,112).

Por último, también se han descrito asociaciones con el sexo, genéticas y ambientales con estos HERV.

Respecto al sexo, se han detectado cifras más altas de carga viral del MSRV-*env* en mujeres que en hombres, lo que se ha justificado por un posible origen en el cromosoma X de dicho agente infeccioso (113).

En cuanto a las relaciones ambientales se sabe que factores epigenéticos, como la disminución de la metilación de ciertas regiones del genoma podría favorecer la activación aumentada de estos agentes HERV (114). O la teoría de los “dos disparos”

según la cual otros virus, entre los que se encuentran el virus herpes humano tipo-1 (HSV-1) (115), el VEB (116) y el HHV-6 (117), podrían transactivar regiones previamente no codificantes del HERV.

3.2.2.2. Vitamina D, tabaco y obesidad

Dos de los factores a los que se ha atribuido la explicación de la relación entre la geografía y la frecuencia de EM son la vitamina D y la luz solar.

Estas hipótesis surgen de numerosos estudios epidemiológicos en los cuales se describe que niveles más altos de vitamina D podrían disminuir el riesgo de sufrir EM (47–51).

Posteriormente, estudios de investigación básica han demostrado diversas acciones inmunomoduladoras de esta vitamina, como son la supresión de interleuquinas inflamatorias, la disminución de la expresión de moléculas co-estimuladoras, la disminución de respuestas Th1 (118), de células T MBP-específicas (119), y de respuestas humorales y proliferación de linfocitos B (120).

Igualmente, modelos animales han relacionado la vitamina D con el desarrollo y severidad de la Encefalomielitis alérgica experimental (EAE) (119–121).

A nivel clínico, muchos otros estudios han encontrado datos muy semejantes que apoyan el efecto protector de la vitamina D.

En uno de estos trabajos se halló que por cada aumento de 10 ng/ml de 25(OH) vitamina D se producía una reducción del 15% en lesiones nuevas en T2, un 32% menos de imágenes captantes de gadolinio, menor discapacidad, y disminución de la tasa de brotes, aunque este último parámetro no alcanzaba la significación estadística (124).

En ensayos con vitamina D como terapia adyuvante a fármacos inmunomoduladores, también se comunicaron efectos beneficiosos de esta vitamina en algunas variables radiológicas analizadas, aunque sin cambios estadísticamente significativos en los datos clínicos (125).

Sin embargo, otras investigaciones, tanto epidemiológicas como terapéuticas con vitamina D no han obtenido los mismos resultados (126–128).

Por último, y para complicar más esta posible relación, se ha sugerido que la exposición solar y la vitamina D no producen efectos idénticos, y que parte del efecto beneficioso de la radiación solar sobre el riesgo de padecer EM iría vehiculada por mecanismos independientes de la vitamina D (129–131).

En cuanto al tabaco, es otro de los principales factores ambientales propuestos, aunque en la mayoría de los estudios el grado de asociación encontrado fue moderado (52,53). El riesgo parece venir unido especialmente a la duración y la intensidad del hábito tabáquico, con menor impacto de la edad a la que se inició el consumo, y parece disminuir tras varios años después su interrupción (54).

Para terminar, la obesidad durante la infancia y la adolescencia es otro de los factores ambientales añadidos más recientemente como posiblemente involucrados en el riesgo de padecer EM (64). Dicho factor parece suponer un mayor impacto en el sexo femenino, aunque, igual que se observó con los factores anteriores, parece ejercer una influencia moderada (61,62).

3.3. Clínica

Atendiendo a su comportamiento clínico existen cuatro tipos de EM (132–134):

- 1) EM remitente recurrente (EM-RR) caracterizada por la aparición de brotes con o sin secuelas, y con periodos de estabilidad entre ellos
- 2) EM primaria progresiva (EM-PP) con progresión continua desde el inicio, pudiendo tener períodos de estabilidad clínica o incluso discretas mejorías.
- 3) EM secundariamente progresiva (EM-SP) que se caracteriza por una etapa inicial con brotes, seguida por otra fase de progresión, con o sin brotes.
- 4) Y por último la EM progresiva recidivante o recurrente (EM-PR), que presenta progresión desde el inicio a lo que asocia brotes evidentes con o sin recuperación, y deterioro continuo entre los brotes. (Figura 5).

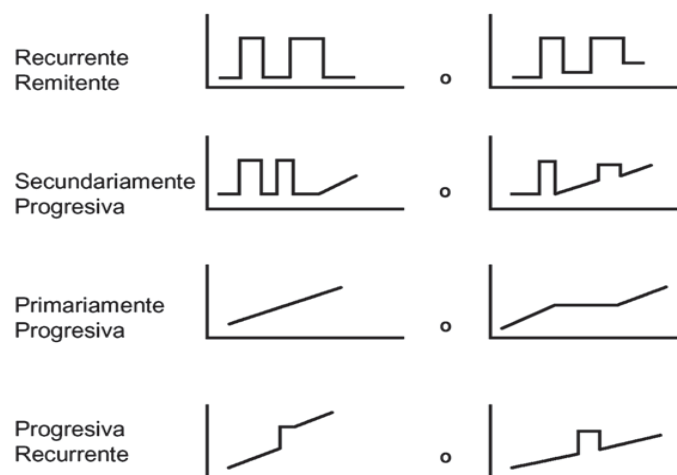


Figura 5. Formas clínico-evolutivas de la esclerosis múltiple. (134)

3.4. Tratamiento

Existen varios tratamientos que han demostrado diferentes efectos beneficiosos en los pacientes con EM, como son el descenso de la tasa de recaídas, la reducción de la progresión de la discapacidad y la disminución de las lesiones en resonancia magnética (RM).

Los primeros fármacos aprobados para las formas EM-RR fueron el interferón beta (IFN- β) 1b subcutáneo (SC) (135), IFN- β 1a intramuscular (IM) (136), el acetato de glatirámico (AG) (137–139), y el IFN- β 1a SC (140).

Los objetivos primarios de eficacia de todos aquellos estudios fueron equiparables, con una disminución de las tasas anualizadas de brotes de alrededor del 30-35%. Los estudios posteriores de seguimiento (141–145), así como los de comparación entre estos tratamientos (146–148), parecen confirmar los datos de efectividad semejante, o superiores, y de su seguridad a largo plazo. Igualmente, estos fármacos también han demostrado su eficacia en pacientes con un primer episodio desmielinizante (SCA) y con RM característica de EM, retrasando el tiempo hasta la aparición de un segundo ataque, y disminuyendo el porcentaje de pacientes con conversión a EM clínicamente definida (149–152).

Por último, diferentes ensayos clínicos han demostrado la eficacia del IFN- β en las formas de EM-SP con persistencia de brotes. En este caso, el beneficio de la terapia es más limitado, y parece ligado fundamentalmente a la modificación de la parte inflamatoria de la enfermedad, con menor influencia sobre el componente degenerativo.

Así, un ensayo europeo, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, demostró una reducción del 22% de los pacientes con progresión confirmada y disminución de la carga lesional en T2 (153).

Un estudio semejante norteamericano también encontró mejoría en la tasa de brotes y en los parámetros de RM, aunque no alcanzó la significación estadística en el tiempo hasta la progresión de la discapacidad (154).

Analizados conjuntamente los dos trabajos se concluía un efecto beneficioso en los pacientes con EM-SP con presencia de al menos un brote en los dos últimos años (155).

Datos semejantes se obtuvieron en sendos estudios aleatorizados y controlados con IFN- β 1a subcutáneo (156), e IFN- β 1a IM (157).

En base a esta información, el IFN- β 1a IM, IFN- β 1a SC, IFN- β 1b y el acetato de glatirámico constituyen el tratamiento de inicio de la mayoría de los pacientes con EM.

Durante los últimos años hemos asistido a grandes avances con la aparición de nuevos fármacos con mayor potencia terapéutica. Éstos son el natalizumab (158,159), fingolimod (160,161), y mitoxantrona (162). En contrapartida, dicha eficacia se acompaña de posibles efectos secundarios más complejos, por lo que estos tratamientos se reservan para los pacientes más agresivos y refractarios a los tratamientos previos.

En el caso del natalizumab está claramente definido el riesgo de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) asociado a su uso en pacientes con serología positiva para el virus JC (163,164). Recientemente además se está estudiando la presencia de bandas

oligoclonales (BOC) IgM lípido-específicas en el LCR de los pacientes con EM como otro posible dato estratificador del riesgo de esta complicación infecciosa (165).

La mitoxantrona es un análogo de la antraciclina utilizado como agente quimioterápico en diferentes cánceres. Los últimos estudios de vigilancia de dicho fármaco han reflejado un riesgo de disfunción sistólica aproximado del 12%, y un riesgo de leucemia de alrededor del 0,8% (166), ambos algo mayores que las cifras publicadas en los primeros artículos (167).

Por último, el fingolimod es un novedoso inmunosupresor selectivo.

Esta situación actual está a punto de complicarse todavía más en los próximos años, por la inminente comercialización en España de nuevos tratamientos que han terminado recientemente los ensayos clínicos en fase II y III, como son la teriflunomida (168,169), el fumarato o BG-12 (170,171), alemtuzumab (172,173), laquinimod (174), daclizumab (175) y ocrelizumab (176).

3.5. Marcadores de respuesta

Un porcentaje de los pacientes con EM-RR tratados con agentes modificadores de la enfermedad de primera línea experimentarán una respuesta clínica inadecuada o subóptima.

Según estudios previos se ha demostrado que este porcentaje de respuesta puede llegar a variar de forma muy amplia, desde cifras alrededor de un 90% hasta un 50%, según los criterios elegidos para definir el fracaso terapéutico. (177–179).

Se han realizado multitud de estudios para hallar posibles datos predictivos de la respuesta terapéutica, sin que se haya conseguido definir características clínicas y/o epidemiológicas que permitan diferenciar entre respondedores y no respondedores.

Por esta razón, y dada también la creciente aparición de los fármacos anteriormente mencionados de segunda línea, resulta de capital importancia encontrar biomarcadores que permitan personalizar el tratamiento, para poder elegir el mejor fármaco en cada paciente concreto, sin arriesgar innecesariamente en aquellos sujetos que fueran a responder a las terapias del primer escalón, no retrasar el inicio de los fármacos de segunda línea en aquellos individuos refractarios, y en este caso, minimizar los riesgos de estos tratamientos.

3.5.1. Marcadores de respuesta del IFN β

El tratamiento más estudiado en este campo es el IFN. En primer lugar, existen numerosos trabajos de marcadores inmunológicos relacionados con la respuesta a este fármaco.

Asociados a una buena respuesta se han publicado: 1) niveles basales bajos de IFN-gamma (180,181); 2) inducción temprana y mantenida de la expresión de TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF) (182–184); 3) aumento de la expresión de la proteína B7-H1 (PD-L1) (185); 4) cantidades superiores de HLA soluble (186–188); 5) disminución de la expresión de VLA-4 (antígeno-4 de activación muy tardío) y niveles superiores de VCAM-1 (molécula de adhesión vascular 1) (189,190); 6) aumento de la expresión de moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y PD-L2 (191,192); y 7) niveles bajos de la actividad inhibitoria de IFN (IIA) (193).

Asociados con una mala respuesta se han descrito: 1) reducción de los niveles séricos de IL-10 (194–196); y 2) aumento de las cifras de IL-17 (197,198); 3) presencia de anticuerpos neutralizantes (199,200).

En cuanto a los estudios serológicos se ha publicado la presencia del virus Herpes humano tipo 6 (HHV6) en sangre y en suero como un factor de mala respuesta (97–99,101).

Por último, otro dato de mal pronóstico de respuesta al IFN- β recientemente descrito es la presencia de bandas oligoclonales de tipo IgM líquido-específicas en el LCR de estos pacientes (201).

Sin embargo, la mayoría de las investigaciones de factores predictivos de respuesta se centran actualmente en la búsqueda de genes modificadores, fundamentalmente SNPs, bien mediante el genotipado individual de genes candidatos, (202–207) o bien mediante análisis de genoma completo (208,209).

En los últimos años se han realizado grandes avances, habiéndose hallado varios genes asociados con la respuesta, con especial importancia de aquellos implicados en la vía del IFN de clase I, y genes del sistema glutamatérgico, aunque, estas asociaciones son todavía débiles, probablemente debido al gran componente poligénico y de interrelación de los diferentes genes implicados (210,211).

El mecanismo de acción del IFN comienza con la unión a su receptor de superficie, un heterodímero formado por las subunidades IFNAR1 e IFNAR2. Respecto a estos genes las evidencias son conflictivas, y por lo tanto no definitivas. En un estudio realizado con pacientes de Irlanda del Norte se halló una asociación con un polimorfismo localizado

en el promotor del IFNAR1 (205). Sin embargo, otros trabajos no han encontrado dicha relación (202,203,206), o tan solo una tendencia hacia la ausencia de brotes, pero sin alcanzar significación estadística, en este caso con un SNP intrónico del IFNAR2 (202).

También se han investigado varios genes participantes en la vía de señalización del IFN, como el JAK1, STAT1, TYK2, JAK2, IRF4, IRF9. Analizados de forma individual no se encontró asociación con la respuesta, aunque diferentes combinaciones alélicas de varios de estos genes sí diferían entre respondedores y no respondedores (206).

Finalmente, en relación con el mecanismo de acción, se han estudiado polimorfismos en regiones promotoras de más de 100 genes inducibles por el IFN. En uno de los artículos se identificaron 4 genes asociados con la respuesta terapéutica: MX1, Catepsina S, subunidad del proteosoma tipo beta8, y IFNAR1 (205), aunque un estudio posterior de otro grupo no halló dicha relación (212)

Otros estudios de genes candidatos relacionados con el mecanismo de acción del IFN-beta incluyen el IL10, el IFNG, el IRF5, genes relacionados con la excitación neuronal, y el complejo HLA.

Un equipo noruego encontró una asociación entre SNP de la región del promotor de IL10 con actividad en RM, aunque no con la actividad clínica (204).

Un grupo español publicó una posible relación entre la respuesta clínica con variantes alélicas en el gen del IFNG (207). Este mismo grupo ratificó posteriormente, en un estudio de replicación, la influencia del glipican 5 (GPC5), un gen expresado ampliamente en neuronas, y, relacionado con la neurogénesis, la neuroprotección y la excitotoxicidad (213).

El IRF5 es un miembro de la familia de los factores reguladores del IFN (IFR) con acciones antivirales y estimulación de la producción de IFN. Polimorfismos de este gen se han asociado tanto con la susceptibilidad a desarrollar EM como con la respuesta al IFN (214).

Por último, respecto a los alelos del complejo HLA I y II no se ha detectado relación con la respuesta terapéutica, o se han obtenido resultados contradictorios (215–217).

Los estudios de genoma completo han hallado estas mismas posibles asociaciones, tanto con genes implicados en el mecanismo de acción del IFN y sus acciones antivirales (como son el ADAR y el IFNAR2) (209), como con genes relacionados con el sistema glutamatérgico (como el glipican 5 y la proteína NPAS3 (208), o el receptor ionotrópico del glutamato AMPA3 (GRIA3) (209).

3.5.2. Mecanismo de acción del acetato de glatirámico

Si bien, y como hemos comprobado, los estudios del IFN están muy extendidos, no ocurre lo mismo con el acetato de glatirámico, sobre el cual el número de trabajos de posibles factores modificadores de su respuesta es considerablemente menor.

El acetato de glatirámico (AG) es una mezcla de polipéptidos sintéticos con una estructura análoga a la de la proteína básica de la mielina (MBP). Cada polipéptido está formado por la combinación aleatoria de 4 aminoácidos (glutamato, lisina, alanina y tirosina) con longitudes variables de entre 40 y 100 residuos (218).

Este compuesto ha demostrado su eficacia en diversos modelos experimentales de EM (219), así como en ensayos clínicos en humanos (137–139,152). Su uso está aprobado para la EM-RR, administrándose por vía subcutánea en una dosis fija de 20 mg al día.

Su modo de acción no se conoce por completo, pero se acepta que actúa regulando diferentes procesos simultáneamente (220–223). (Figura 6).

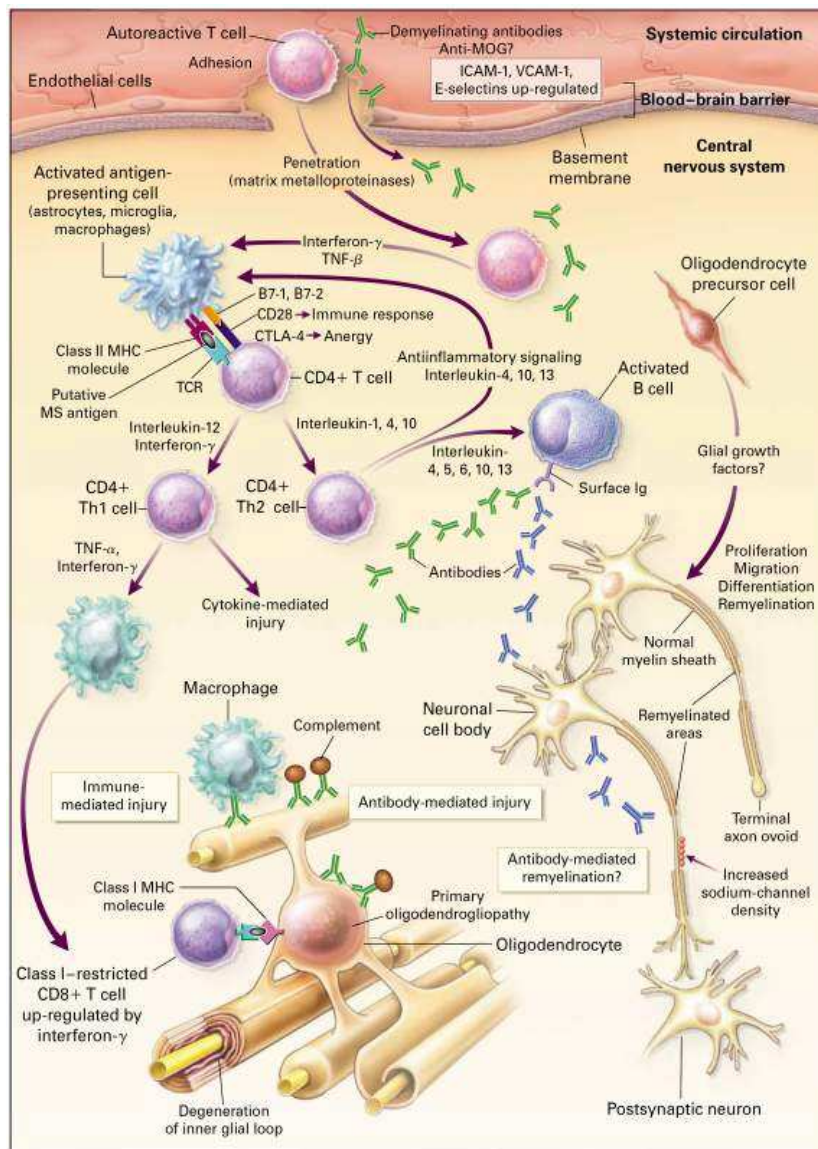


Figura 6. Posibles dianas terapéuticas del acetato de glatirámico. (36).

Debido a su composición polipeptídica de pequeño tamaño, el AG puede unirse con gran facilidad a un elevado número de moléculas HLA-II sin necesidad de procesamiento (224).

Por este motivo los primeros mecanismos propuestos se centraron en las células T. Inicialmente se pensaba que sus efectos clínicos se debían a un cambio en el patrón de los linfocitos T. El tratamiento con AG produce una expansión de los linfocitos antiinflamatorios Th2 y sus citoquinas (IL4, IL6, IL10), y una disminución de los linfocitos Th1 proinflamatorios (225). Estas células Th2 periféricas-reactivas frente al AG migrarían al sistema nervioso central donde reaccionarían, mediante reactividad cruzada con la MBP, (y posiblemente otros antígenos derivados de la mielina). Esta reacción generaría una respuesta protectora antiinflamatoria, por un mecanismo denominado en inglés bystander suppression (226–228).

El AG también podría competir directamente a nivel del SNC con la MBP por la unión a las moléculas HLA impidiendo así sus acciones patogénicas, o unirse como antagonista al receptor de las células T (TcR)-mielina-reactivas dejándolas inactivas o en apoptosis (223,229). Estas últimas acciones son menos probables, por la posible degradación del AG antes de alcanzar el SNC.

A otro nivel, el Acetato de Glatirámico ha demostrado aumentar los niveles de Foxp3. Este factor de transcripción está asociado con la generación de las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (Treg o Th3) (230,231), las cuales tienen un papel protector y de vigilancia sobre células autoreactivas.

Para terminar con las células T, también se ha demostrado la participación de los linfocitos CD8 en la patogenia de la EM y en el mecanismo de acción del AG. Se ha comprobado que los pacientes con EM tienen una actividad disminuida de estas células (232). El tratamiento con AG revierte esta alteración produciendo una expansión de estos CD8, que ejercerían acciones bien reguladoras, o bien citotóxicas sobre linfocitos T-autoreactivos (232,233).

Los macrófagos también se han relacionado con el mecanismo de acción del AG. Se ha observado que el tratamiento con este fármaco promueve la producción de monocitos tipo II. Estos monocitos tienen aumentada la secreción de IL10 (234) y disminuida la de TNF-alfa e IL12, (234,235), y han demostrado capacidad protectora en el modelo de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) (236).

Por último se ha demostrado recientemente la participación de las células B dentro de las acciones terapéuticas del AG. Durante años se creyó que la función de los linfocitos B era fundamentalmente la producción de anticuerpos. Actualmente se sabe que también participan como células presentadoras de antígenos (APC), y que pueden ejercer importantes acciones reguladoras (células Breg) (237–240). En esta dirección, se ha demostrado que el tratamiento con AG promueve el desarrollo de células Breg productoras de citoquinas antiinflamatorias IL10, IL4 e IL13 con acciones protectoras en un modelo de EAE (241), y reduce las células B patogénicas, medido por una disminución de BAFF (factor de activación de células B de la familia TNF-alfa) (242).

Junto con todas estas acciones inmunológicas, se acepta que el AG también puede ejercer un papel neuroprotector y neuroregenerador, como se ha sugerido tras la

demostración de la producción de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) por parte de las células T activadas por AG (243,244). (Figura 7).

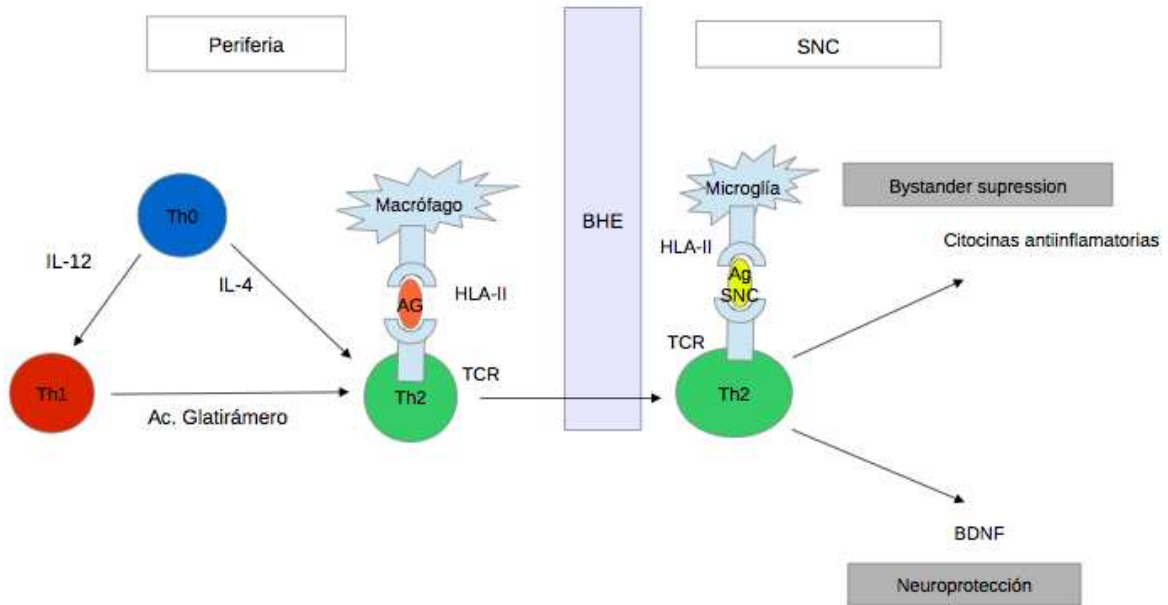


Figura 7. Mecanismos de acción del acetato de glatirámero. BHE: Barrera hemato-encefálica; AG: acetato de glatirámero; Ag SNC: Antígeno mielina del Sistema nervioso central; BDNF: Factor de crecimiento derivado del cerebro. (245).

3.5.3. Marcadores de respuesta al acetato de glatirámero

Debido a todos estos diversos y complejos mecanismos de acción, podrían existir múltiples factores modificadores de la respuesta terapéutica al AG.

A nivel inmunológico se han descrito varios perfiles que podrían ayudar a predecir el grado de respuesta. Aun así, la potencia de los estudios es pequeña, dado el bajo número de pacientes estudiados, y la asociación ligera.

Farina et al, publicó un rasgo inmunológico asociado al tratamiento con AG. En concreto, la reducción de la respuesta proliferativa al AG, activación de células CD8+ productoras de IFN-gamma, y activación de células CD4+ productoras de IL4 (246).

En un trabajo posterior, los mismos autores analizaron si dicho patrón inmunológico se podría relacionar con el patrón de respuesta clínica. Obtuvieron resultados positivos, aunque el estudio solo contaba con 24 pacientes en total (247).

Otro grupo analizó el mismo patrón inmunológico, encontrando que la respuesta al AG ocurría en pacientes con niveles estables de IL4 y niveles reducidos de IFN-gamma, pero no obtuvo la relación anterior entre respuesta clínica y respuesta proliferativa al AG (248).

Por último, también se ha señalado una posible correlación entre respondedores al AG con el aumento de los niveles de IL13 e IL5 (249), y disminución de la actividad en RM con el aumento de la expresión RNA mensajero de GATA3 y linfotoxina beta (250).

En cuanto a los estudios genéticos solo existen 4 trabajos publicados (251–254). De estos trabajos han surgido varios genes candidatos.

Uno de ellos es el alelo HLA-DRB1*1501 (251,252). En uno de los estudios se observó una mejor respuesta, medida como porcentaje de respondedores y como disminución de la tasa de brotes, en aquellos pacientes positivos para el gen HLA-DRB1*1501 respecto a los sujetos negativos para este alelo (251).

En otro trabajo posterior se analizó la influencia de un polimorfismo del HLA-DRB1*1501(SNP rs3135388) sobre la respuesta terapéutica al AG. Se encontró un mayor tiempo libre de eventos clínicos o radiológicos (definidos como ausencia de

brotes, ausencia de nuevas lesiones T2 o T1 con contraste, y ausencia de cambios en la Expanded Disability Status Scale (EDSS)) en los pacientes homocigotos para el alelo A, respecto a los heterocigotos u homocigotos para el G (252).

Estas asociaciones no fueron replicadas en otros estudios posteriores (253,254). Sin embargo, esta variabilidad en los resultados obtenidos en diferentes investigaciones no significa necesariamente una falta de asociación, sino que la intensidad de dicha relación podría estar modificada por otros factores tanto genéticos como ambientales.

En este sentido, uno de estos estudios encontró una predicción de la ausencia de respuesta al AG para la combinación del HLA-DRB1*15 con otros genes. En concreto, se halló entre 14 y 15 veces mayor riesgo de fracaso terapéutico del AG en pacientes con las combinaciones “DRB1*15 + TGFB1*T + CCR5*d + IFNAR1*G” y “DRB1*15 + TGFB1*T + CCR5*d”, mientras que dicha relación no se cumplía si estos alelos eran analizados de forma individual (253).

Por último, otros trabajos han descrito nuevos posibles genes candidatos asociados con la respuesta al AG, como es el caso de los genes del receptor beta de las células T (TcRB β) (receptor del complejo HLA-péptido), la catepsina S (CTSS) (proteasa de degradación de la MBP, de las cadenas fijas del HLA-II, y posiblemente del propio AG), polimorfismos de la propia MBP, CD86 (molécula co-estimuladora para la activación de las células T), FAS (proteína implicada en la apoptosis), y receptores de las interleuquinas proinflamatorias IL1 e IL12 (IL1R1 e IL12RB1) (254).

4. HIPÓTESIS

La variabilidad observada en la respuesta de cada paciente a cada uno de los tratamientos disponibles para la EM, junto con las múltiples dianas terapéuticas de estos fármacos y el origen multifactorial y poligénico de la etiopatogenia de esta enfermedad, hacen pensar que existen factores individuales que influyen en el grado de efectividad de dichos tratamientos.

Pensamos que dichos factores podrían ser de tipo clínico, epidemiológico, genético y/o ambiental.

Estos datos podrían ser útiles para aplicarse en la práctica diaria como marcadores predictivos de la efectividad terapéutica del acetato de glatirámico previo al inicio del tratamiento, y como marcadores de respuesta subóptima precoz a este fármaco inmunomodulador.

5. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Los objetivos del estudio son

1. Analizar la efectividad y tolerabilidad del tratamiento con acetato de glatirámero en pacientes con esclerosis múltiple recurrente – remitente (EM-RR) y esclerosis múltiple secundariamente progresiva (EM-SP), en condiciones de práctica clínica habitual.
2. Analizar factores clínicos (sexo, edad de inicio, tipo de tratamiento previo, EDSS basal y número de brotes en los 2 años anteriores al inicio del tratamiento) que pudieran estar asociados al grado de respuesta al acetato de glatirámero.
3. Analizar la posible asociación del virus HHV-6 con la respuesta clínica al acetato de glatirámero a través del estudio de la variación en los títulos de los anticuerpos IgG e IgM frente a dicho virus a lo largo del tratamiento.
4. Analizar la posible asociación de las variantes alélicas del HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1 con la respuesta al acetato de glatirámero
5. Analizar la posible asociación de 42 SNPs implicados en la patogenia de la EM según la descripción de uno de los últimos GWAS (SNPs-GWAS), con la respuesta al acetato de glatirámero.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Diseño del estudio

Estudio retrospectivo observacional de una cohorte de pacientes con Esclerosis múltiple, mediante revisión de las historias clínicas de los pacientes en seguimiento en las consultas de la Unidad de enfermedades desmielinizantes del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

Los pacientes dieron su autorización, previo firma de consentimiento informado, para la participación en este estudio, recogida de la información clínica, y extracción de muestras de sangre.

El trabajo cumplía los requisitos de la declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité ético del Hospital Clínico San Carlos. Los resultados del estudio son totalmente confidenciales sin posibilidad de reconocimiento individual del paciente, y realizando todas las medidas oportunas para preservar dicha confidencialidad según la ley de protección de datos de 1999.

6.2. Población del estudio

Se incluyeron a todos los pacientes con diagnóstico de esclerosis múltiple recurrente – remitente (EM-RR) según los criterios de McDonald 2010 (255), y a los pacientes con esclerosis múltiple secundariamente progresiva (EM-SP) según la definición de Lublin 1996 (134), que hubieran presentado al menos 1 brote en los dos años anteriores al inicio de la recogida de la información, de los que se disponía de muestras de sangre para análisis de ADN y serología virales, y que estuvieran en tratamiento o hubieran recibido en algún momento tratamiento con acetato de glatirámico (AG) (Copaxone®) durante un mínimo de dos años. También se incluyeron a aquellos pacientes que

habiendo iniciado tratamiento con AG lo hubieran tenido que suspender antes de los dos años de observación por cumplir criterios de no respondedor.

Se recogieron las variables epidemiológicas: sexo y fecha del inicio de los síntomas de la EM.

Se recogieron las variables clínicas: tratamientos previos al AG, fecha de inicio de AG, tasa anualizada de brotes (TAR) en los dos años previos al inicio del AG, efectos secundarios al AG, puntuación de la Expanded Disability Status Scale (EDSS) previa al inicio del estudio, número de brotes durante el tratamiento con AG, EDSS cada 6 meses durante el seguimiento, y en los casos en los que se suspendió el tratamiento con AG, fecha de retirada y motivos del cambio de tratamiento.

6.3. Definiciones

Se definió brote como cualquier síntoma neurológico focal, nuevo o empeoramiento de síntomas antiguos, de más de 24 horas de duración, separado de cualquier otro síntoma neurológico focal un mínimo de 30 días, y sin la coexistencia de fiebre, infecciones o cualquier otro desencadenante sistémico.

La definición de progresión de la discapacidad (PD) dependía de la puntuación EDSS previa al inicio de AG. 1) aumento de 1,5 puntos o más, si la EDSS previa era de 0; 2) aumento de 1 punto o más si la EDSS previa era de 1 hasta 5; y 3) aumento de 0,5 puntos o más si la EDSS era 5.5 o superior.

Se clasificó como uso de AG en 1ª línea a los pacientes naïve y a aquellos que habían comenzado IFN β y se les retiró por intolerancia/efectos secundarios.

Se denominó como uso de AG en 2ª línea a aquellos enfermos que provenían de tratamiento previo con IFN- β y se les sustituyó por falta de efectividad, o tratamiento previo con fármacos inmunosupresores (natalizumab, mitoxantrona o azatioprina).

Se consideró respondedor (R) a aquellos pacientes que se mantuvieron estables durante los dos años de estudio, con 1 brote como máximo y sin PD.

Se definió no respondedor (NR) a aquellos pacientes que tuvieron 2 o más brotes y/o experimentaron una progresión de la discapacidad durante el tratamiento con AG. Algunos de los pacientes no cumplieron los dos años de tratamiento con este fármaco, ya que fueron cambiados a otras opciones terapéuticas antes de dicha fecha, como consecuencia de la presencia precoz del fallo terapéutico. A pesar de no haber cumplido los dos años de tratamiento del estudio estos pacientes fueron incluidos en el análisis estadístico como NR.

Estos criterios de R y NR estrictos fueron elegidos por ser los utilizados de manera más extendida en la mayoría de los estudios, y para optimizar la detección de las asociaciones más robustas, y por lo tanto asociadas con la respuesta al AG de una forma más segura, aunque a cambio se produjera una pérdida en la detección de asociaciones más débiles (138,139,251,254).

6.4. Recogida y procesamiento de las muestras

En la visita basal, previa al inicio de AG, se extrajeron muestras de sangre para el análisis de ADN, y muestras de suero para la realización de la serología viral de HHV-6. Las muestras de suero fueron tomadas de nuevo en cada visita de seguimiento y en caso de brotes de EM.

La muestra de sangre consistía en 10 ml de sangre periférica obtenida mediante venopunción y almacenada en tubos estériles con EDTA. Dichas muestras fueron utilizadas para la extracción directa de ADN.

El suero era obtenido mediante centrifugación, recogándose 2 ml de muestra, que se separaba en alícuotas y se almacenaba a -80°C, para la posterior determinación de anticuerpos IgG frente al HHV-6.

6.5. Extracción de ADN de PBMCs y suero

Las PBMCs fueron extraídas después de centrifugar aproximadamente 8 ml de sangre total en tubos CPT (Becton Dickinson, NJ, USA) a 2.500 g durante 30 minutos. El ADN de estas células fue extraído siguiendo las instrucciones de la casa comercial con el QIAamp ADN Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

El suero se obtuvo tras la centrifugación de unos 5 ml de sangre total en tubo secos a 2.500 g durante 14 minutos.

Durante el proceso de extracción de ADN, por cada grupo de 15 muestras se introdujo 1 blanco (mezcla de reacción y PBS) con el fin de evaluar la existencia de una posible contaminación entre muestras. Todas estas muestras fueron alícuotadas y posteriormente almacenadas a -80°C hasta su procesamiento y/o posterior análisis.

La cuantificación de ADN extraído de PBMCs se llevó a cabo por espectrofotometría ($\lambda=260$ nm) (BioPhotometer, Eppendorf) valorando la pureza del mismo ($A_{260/280}$), siempre mayor de 1,7, y permitiendo ajustar la concentración a 40 ng/ μ l con el eluyente de la extracción. Esta cuantificación de ADN se realizó teniendo en cuenta que una unidad de DO (densidad óptica) se corresponde con 50 ng/ μ l.

6.6. Determinación de los niveles de anticuerpos IgG e IgM anti-HHV-6

Se llevó a cabo en muestras de suero recogidas en las visitas programadas. El ensayo se realizó mediante un método de ELISA (Panbio) con pocillos recubiertos con el antígeno del HHV-6. La detección y cuantificación de las inmunoglobulinas anti-HHV-6 que quedan unidas al antígeno en los pocillos, se llevó a cabo mediante una reacción colorimétrica utilizando un conjugado de peroxidasa y el cromógeno TMB (tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno) como sustrato de la enzima. Las medidas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 450 nm con un filtro de referencia de 600-650 nm (Tecan) tras detener el desarrollo de la reacción con una solución de parada (ácido fosfórico 1 M).

Para la calibración, se midieron los calibradores por triplicado, realizándose un control negativo y positivo por cada 40 muestras.

El resultado del título de anticuerpos se presentó en unidades Panbio. Para el cálculo de la prevalencia se consideró títulos de Ig mayores o iguales a 9 unidades Panbio como positivo.

6.7. Genotipado HLA

El tipaje del locus HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1 se llevó a cabo mediante la técnica PCR-SSOP (Polymerrase Chain Reaction-Sequence SpecificOligonucleotid Probe). Lo que implica la amplificación mediante PCR del segundo exón de cada uno de estos genes por ser en ellos donde se concentran los polimorfismos que distinguen los alelos. A continuación, el producto es transferido a una membrana de nitrocelulosa mediante la técnica de Dot-Blot. Posteriormente, los productos transferidos se hibridan con sondas oligonucleotídicas específicas de alelo marcadas con digoxigenina para

proceder al revelado (por quimioluminiscencia) y finalmente a la interpretación de los resultados.

6.8. Genotipado alelo DRB1*15:01

La presencia del principal alelo de susceptibilidad para EM, el alelo DRB1*15:01, fue determinada mediante el genotipado del SNP rs3135388. Este SNP presenta una correlación mayor del 0,94 con el alelo DRB1*15:01, y para tiparlo utilizamos un ensayo TaqMan ya validado con anterioridad (256,257). Esta técnica se empleó en aquellos individuos en que el tipaje PCR-SSOP indicaba existencia del alelo HLA-DRB1*02.

En todos estos ensayos Taqman, se utiliza una MasterMix común [enzima DNA polimerasa (Taq Gold), buffer, nucleótidos, MgCl₂ y amperasa (para degradar cualquier amplicón inespecífico)] y los primers y sondas específicos de cada SNP de estudio. Las sondas se marcan en su extremo 5' con un fluoróforo FAM (6-carboxifluoresceína) o VIC (4, 7, 2', 4', 5', 7',-hexaclaro-6-carboxifluoresceína), y en su extremo 3' presentan un quencher. Esta técnica está basada en una qPCR, de tal forma que dependiendo del fluoróforo que emita la señal sabremos que alelo/s están presentes en cada muestra. El equipo utilizado para este tipo de ensayos fue el ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con las siguientes condiciones de PCR: a) 2 minutos a 50°C (amperasa activada) b) 10 minutos a 95°C (polimerasa activada) y c) 40 ciclos: 15 segundos a 92°C (desnaturalización) y 1 minuto a 60°C (hibridación y elongación).

6.9. Genotipado SNPs-GWAS

El genotipado de los SNPs-GWAS se realizó en el CEGÉN con la tecnología iPLEX® Gold MassARRAY Sequenom (258).

Esta técnica consta de dos fases. En primer lugar se amplifican los fragmentos de ADN que contienen los SNP's de interés mediante una PCR multiplex. A continuación se lleva a cabo la reacción de discriminación alélica, que termina al añadir la base diferente (extensión de única base o SBE). La diferencia de masas entre ambas bases se detecta mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Las reacciones tienen lugar en placas de 384 pocillos, con un volumen final de 9 µl, y los productos de dichas reacciones son transferidos de forma automatizada mediante un robot a la superficie del chip, que será leído en el espectrómetro de masas.

Con esta química es posible genotipar hasta 36 variantes (SNPs) por ensayo, con una media de 24.

6.10. Análisis de la asociación entre la serología frente al HHV-6 y la respuesta al acetato de glatirámico

Se estudió la variación porcentual respecto al valor basal de IgG e IgM tras el 2º año de tratamiento con AG.

Al tratarse de una variable cuantitativa continua, para mejorar la sensibilidad de los análisis estadísticos, el cambio porcentual de los títulos de anticuerpos se categorizó, dividiéndose la muestra en 5 grupos.

- 1) Aumento o no disminución de los valores de IgG/IgM.
- 2) Disminución menor de un 5%.

- 3) Disminución mayor de 5% pero menor de 10%.
- 4) Disminución mayor del 10% pero menor del 20%.
- 5) Disminución mayor del 20%.

6.11. Análisis de la asociación del HLA-II con la respuesta al acetato de glatirámero

Dado el elevado desequilibrio de ligamiento entre los diferentes alelos del sistema HLA, la asociación de la respuesta al AG se realizó con el locus HLA-DRB1.

Se compararon los grupos portadores de al menos un alelo (es decir, sujetos homocigotos y heterocigotos) frente a pacientes sin dicho alelo.

En caso de encontrarse una respuesta estadísticamente significativa con alguno de estos alelos del HLA-DRB1, se pasaría a la valoración de diferentes haplotipos en función de los genes de los otros dos alelos HLA-DQA1 y HLA-DQB1.

6.12. Análisis de la asociación de los SNPs-GWAS con la respuesta al acetato de glatirámero

Se seleccionaron 42 SNPs de los 57 que han sido descritos asociados al riesgo de padecer EM en uno de los últimos GWAS del grupo internacional de genética en esclerosis múltiple (38).

Estos SNPs fueron elegidos para incluir las diferentes vías patogénicas de la EM, sobre las cuales podrían actuar los diferentes mecanismos terapéuticos del AG, así como en base a publicaciones previas en las que se sugieren algunos de estos genes como posibles candidatos modificadores de la respuesta (253,254).

Además, entre estos 57 SNPs descritos previamente se encuentran 3 variantes cuyos genes son desconocidos en el momento actual. A pesar de este hecho, y para evitar que este desconocimiento pudiera impedir el estudio de SNPs que pudieran estar relacionadas con el mecanismo de acción del AG, estos 3 SNPs fueron también incluidos en los 42 SNPs estudiados en este trabajo.

Los SNPs seleccionados fueron:

- 1) rs10201872 (C/T). Gen SP140. Alelo de frecuencia menor (MAF): T=0,100/217. Codifica la proteína SP140, proteína con dominio de zinc que forma parte del cuerpo nuclear. Participa en funciones de regulación del sistema inmune y de transcripción (259,260).
- 2) rs10466829 (A/G). Gen CLECL1. MAF: A=0.498/1084. Codifica para la proteína C-type lectin-like domain family 1. Actúa como molécula co-estimuladora de las células T, favoreciendo respuestas tipo Th2 y aumentando la producción de IL-4 (259,261).
- 3) rs11129295 (C/T). Gen EOMES (eomesodermin homolog). MAF: C=0.494/1076. Interviene en la diferenciación de los linfocitos T CD8+ durante la respuesta inmune, regulando la transcripción de genes efectores líticos. Su expresión se ve aumentada en presencia de TGFB1 e IL-4 (259,262,263).
- 4) rs11154801 (A/C). Gen MYB. MAF: A=0.287/626. Protooncogen de la familia MYB (“mielobastosis”) de factores de transcripción. Regula funciones de diferenciación y proliferación de los progenitores hematopoyéticos, con especial importancia en el desarrollo y mantenimiento de la respuesta Th2 (264,265).

- 5) rs11810217 (C/T). Gen EVI5 (Ecotropic viral integration site 5). MAF: T=0.153/334. Oncogén que actúa regulando el ciclo celular. Su depleción ocasiona alteraciones y detención de la mitosis (266).
- 6) rs12212193 (A/G). Gen BACH2. MAF: G=0.300/653. Factor de transcripción de la familia bZIP (basic leucine zipper) En modelos animales se han observado funciones de este gen en la maduración de las células B y producción de inmunoglobulinas (267,268), y en la formación de células T reguladoras (Treg) y disminución de la diferenciación a células T efectoras Th1 Th2 y Th17 (269).
- 7) rs12368653 (A/G). Gen CYP27B1. MAF: A=0.317/690. Enzima de la familia del citocromo P450. Se encuentra localizada en la membrana interna mitocondrial. Metaboliza el último paso de la síntesis de Vitamina D al hidroxilar la 25-dihidroxi-vitamina D3 a la forma activa 1-alfa, 25-dihidroxi-vitamina D3 (270).
- 8) rs12466022 (A/C). (Gen no conocido). MAF: A=0.304/663.
- 9) rs1250550 (G/T). Gen ZMIZ1. MAF: T=0.295/643. Factor de transcripción. Regula diversos procesos celulares, aunque se conoce poco sobre esta proteína (271).
- 10) rs13192841 (A/G). Gen no conocido. MAF: A=0.189/411.
- 11) rs13333054 (C/T). Gen IRF8. MAF: T=0.302/657. Factor de transcripción de la familia de factores reguladores de los IFN de tipo I (IFN-alfa e IFN-beta) y genes del HLA-I inducibles por IFN. Presente mayoritariamente en células del

sistema inmunitario, actúa regulando su diferenciación y la respuesta inmunitaria, a través de la unión con el heterodímero BATF-JUNB (272,273).

12) rs1335532 (C/T). Gen CD58 o LFA-3. MAF: C=0.382/832. Expresado en las células presentadoras de antígeno (APC). Es el ligando del receptor CD2 de las células T, y actúa favoreciendo la unión entre ambos tipos celulares (274).

13) rs140522 (A/G). Gen SCO2. MAF: A=0.376/819. Proteína de ensamblaje para la síntesis de la citocromo C oxidasa. Permite la unión de Cobre a dicha enzima, para su correcto funcionamiento en producción de energía en la cadena respiratoria mitocondrial. Mutaciones de esta proteína se ha asociado con una forma fatal de cardio-encefalo-miopatía infantil (275).

14) rs1520333 (C/T). Gen IL7. MAF: C=0.415/904. Interleuquina que actúa sobre los progenitores linfoides inmaduros, favoreciendo su desarrollo, especialmente las células B (276).

15) rs17066096 (A/G). Gen IL22RA2. MAF: G=0.172/375. Codifica para una proteína soluble que se une al receptor de IL-22 actuando como antagonista de esta citoquina y evitando sus acciones inflamatorias (277,278).

16) rs17174870 (C/T). Gen MERTK. MAF: T=0.218/475. Protein-quinasa. Se ha relacionado con diversas funciones celulares, entre las que destacan diferenciación celular, migración celular y fagocitosis de células apoptóticas. A nivel inmunológico tiene acciones antiinflamatorias, regulando a la baja vías de señalización de citoquinas inflamatorias a través de la inhibición de los receptores Toll-like (279).

- 17) rs1738074 (A/G). Gen TAGAP. MAF: A=0.441/961. GTPasa. Participa en procesos de activación de las células T (280).
- 18) rs2019960 (C/T). Gen PVT1. MAF: C=0.243/530. Oncogén relacionado con el factor de transcripción c-myc. Se encuentra alterado en diferentes tumores, principalmente neuroblastoma y procesos linfoproliferativos (281,282).
- 19) rs2119704 (A/C). Gen GALC. MAF: A=0.129/280. Galactocerebrosidasa. Metaboliza la galactosilceramida, uno de los principales lípidos de la mielina. (283)
- 20) rs2243123 (C/T). Gen IL12A. MAF: C=0.198/431. Subunidad alfa de la IL-12. Necesaria para la inducción de IFN-gamma independiente de linfocitos T, y para la diferenciación de las células Th1 y Th2 (284).
- 21) rs2248359 (C/T). Gen CYP24A1. MAF: T=0.439/956. Codifica la proteína 1-25 dihidroxi-vitamina D3 24 hidroxilasa, proteína de la familia del citocromo P450, que participa en el metabolismo del calcio, iniciando la degradación de la vitamina D activa (285).
- 22) rs2283792 (G/T). Gen MAPK1. MAF: T=0.459/1000. Pertenece a la familia de las proteín-quinasas activadas por mitógeno (MAPK). Interviene como factor de transcripción en múltiples procesos celulares, como división celular, endocitosis, quimiotaxis, apoptosis, etc (259). A nivel inmunológico y, en modelos animales, se ha observado una disminución de los linfocitos CD4 y CD8 maduros (286).

- 23) rs2293370 (C/T). Gen CD80. MAF: T=0.210/458. Molécula co-estimuladora presente en las APC. Media la unión con los linfocitos T durante la presentación antigénica (287).
- 24) rs2300603 (C/T). Gen BATF. MAF: C=0.221/481. Pertenece a la superfamilia Activadores de la proteína 1 (AP-1) de los factores de transcripción bZIP. Actúa en la elaboración y mantenimiento de la respuesta inmune, regulando la activación de varios linajes celulares, entre los que se encuentran la diferenciación hacia células Th17 (288,289), células T foliculares (Thf) (289), células dendríticas (290), células CD8 (291) y células B (292).
- 25) rs2303759 (G/T). Gen CD37. MAF: G=0.270/588. Proteína de la superfamilia de transmembrana-4. Presente mayoritariamente en la superficie celular de los linfocitos B. Podría intervenir en la transducción de diferentes funciones celulares, y en las interacciones entre T y B (293).
- 26) rs2546890 (A/G). Gen IL12B. MAF: A=0.433/944. Subunidad beta de la interleuquina inflamatoria IL12 (284).
- 27) rs3118470 (C/T). Gen IL2RA. MAF: C=0.319/694. Subunidad alfa del receptor de IL2, también denominada CD25. La unión de la IL-2 a su receptor induce la proliferación de diferentes poblaciones linfocitarias. Es la diana del fármaco inmunosupresor Daclizumab, en investigación para el tratamiento de la EM (175).
- 28) rs4410871 (C/T). Gen MYC. MAF: T=0.298/650. Protooncogen implicado en la regulación de la división y el ciclo celular (294).

- 29) rs4613763 (C/T). Gen PTGER4. MAF: C=0.110/239. Receptor 4 de la prostaglandina E, con acciones anti-inflamatorias (295,296).
- 30) rs4648356 (A/C). Gen MMEL1. MAF: A=0.420/914. Metallo-endopeptidasa de membrana tipo 1. Se conoce poco sobre las funciones de este gen. Se supone que, al igual que otras metaloproteasas, está implicada en la degradación de diversos péptidos de pequeño tamaño (297).
- 31) rs4902647 (C/T). Gen ZFP36L1. MAF: C=0.497/1083. Codifica la proteína zinc finger protein 36 C3H1 type-like 1 o también conocida como factor de respuesta al butirato. Es un factor de transcripción celular del grupo de los genes de respuesta rápida. Interviene en múltiples acciones celulares, especialmente en la respuesta a factores de crecimiento, y, en menor medida, la regulación de células T y B (298,299).
- 32) rs669607 (G/T). Gen no conocido. MAF: T=0.389/847
- 33) rs7200786 (A/G). Gen CLEC16A. MAF: A=0.492/1072. Proteína con dominio de lectina tipo C. Presente en células B, Natural Killers y células dendríticas. Asociada con el riesgo de desarrollar diferentes enfermedades autoinmunes (300).
- 34) rs7238078 (G/T). Gen MALT1. MAF: G=0.226/492. Paracaspasa esencial en la activación de células T, y, en menor medida, de las células B, a través del factor de transcripción Nuclear Factor Kappa Beta (NF-kappaB) (301).

- 35) rs7522462 (A/G). Gen KIF21B. MAF: A=0.150/326. Codifica una proteína de tipo quinesina, cuya acción principal es el transporte axonal. Dada esta función, se especula que podría tener un papel neurodegenerativo en la EM (302).
- 36) rs7595037 (C/T). Gen PLEK. MAF: C=0.352/767. Codifica la proteína Pleckstrin. Es uno de los principales sustratos de la protein-quinasa C de las plaquetas. No se conoce con exactitud su función, aunque se postula que podría actuar regulando diferentes funciones celulares, como por ejemplo agregación plaquetaria y coagulación, organización del citoesqueleto, diferenciación de células hematopoyéticas, señalización y tráfico celular, entre otras (303–306).
- 37) rs7923837 (A/G). Gen HHEX. MAF: A=0.427/930. Forma parte de los factores de transcripción de la familia homeobox. En modelos animales se ha encontrado la participación de este gen en la formación de células B y producción de anticuerpos (307).
- 38) rs802734 (C/T). Gen THEMIS. MAF: C=0.198/432. Controla la correcta maduración y selección de los linfocitos T (308).
- 39) rs8112449 (A/G). Gen TYK2. MAF: A=0.351/765. Tirosin-quinasa 2. Interviene en las vías de señalización de los IFN-I e IFN-II y varias citoquinas entre las que se encuentran la IL-12, IL-6, IL-10 e IL-23 (309).
- 40) rs874628 (C/T). Gen MPV17L2. MAF: C=0.192/418. Proteína-2 de membrana de mitocondria. Se desconoce su función exacta.

41) rs9282641 (A/G). Gen CD86. MAF: A=0.050/109. Molécula co-estimuladora de los linfocitos T (310–312).

42) rs949143 (A/G). Gen ARL6IP4. MAF: G=0.462/1007. Codifica para una proteína de función desconocida, aunque se piensa que puede intervenir en funciones de “splicing” (313).

6.13. Análisis de las interacciones entre los alelos HLA, SNPs-GWAS y HHV-6 sobre la respuesta al acetato de glatirámico

Se valorarán, en caso de encontrarse alguna asociación individual, interacciones entre los alelos HLA con los SNP's, los niveles de anticuerpos anti-HHV6 con los alelos HLA, las cifras de anticuerpos anti-HHV6 con los SNP's, y por último, las interacciones entre los diferentes polimorfismos SNP's entre sí.

6.14. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software IBM© SPSS statistics® para windows, versión 19, y con el programa STATCALC.

Las variables categóricas fueron representadas con sus números absolutos y distribución de frecuencias.

La EDSS fue utilizada para los cálculos estadísticos como una variable cuantitativa continua, igual que en la mayoría de los trabajos realizados por otros grupos, dada la correlación lineal entre la puntuación EDSS y la situación clínica.

Las variables cuantitativas se resumieron con su media, mediana, proporciones, desviación estándar, intervalos de confianza al 95% y rango. Los estadísticos de las variables cuantitativas continuas fueron calculados aplicando la Ley Normal.

El análisis de la reducción de la TAR se realizó mediante la prueba t de Student para medidas intrasujeto, por el procedimiento T-Test PAIRS del IBM © SPSS statistics ®.

El estudio de la asociación de los datos clínicos con la respuesta al acetato de glatirámico se realizó mediante regresión logística binaria. Se usó como medida de asociación la odds ratio (OR). Se seleccionó como criterio para resultado positivo del modelo de regresión una probabilidad de evento positivo del 50%. Para medir el grado de significación estadística de los resultados se utilizó la prueba de Chi-cuadrado y los intervalos de confianza de la OR al 95%.

Para el análisis de la asociación entre el cambio porcentual de IgG e IgM respecto al valor basal con la respuesta terapéutica al acetato de glatirámico se utilizó también la regresión logística binaria. Igual que en el caso anterior se usó la OR como medida de asociación, y para la significación estadística se valoró el valor de la prueba Chi-cuadrado y el intervalo de confianza de la OR al 95%.

El análisis de la asociación del cambio porcentual de IgG e IgM respecto al valor basal con el número total de brotes durante los dos años de tratamiento, y con el cambio de EDSS se realizó mediante regresión múltiple.

La valoración de la calibración de los modelos predictivos de regresión logística se realizó con la prueba de bondad de ajuste de Hosmer y Lemeshow, y para los de regresión múltiple el coeficiente de correlación R^2 .

El estudio de la asociación de las diferentes variantes alélicas del sistema HLA y los SNP's con la respuesta terapéutica al acetato de glatirámico se realizó mediante tablas de contingencia por el procedimiento CROSSTABS de IBM © SPSS statistics ®. Igual que en los casos anteriores se utilizó como medida de asociación la OR, y para la

estimación de la significación estadística se empleó la prueba de Chi-cuadrado y el intervalo de confianza de la OR al 95%.

El cálculo del poder de clasificación de los modelos se realizó mediante la estimación del área debajo de la curva, por el procedimiento COR de IBM © SPSS statistics ®.

Para la valoración de posibles factores de interacción entre diferentes variables se calculó el cambio de significación global del modelo mediante un “chunk test” por regresión logística de exclusión secuencial por pasos (BACKSTEP LOGISTIC REGRESSION). Dicho test consiste en valorar si la retirada de dichos factores de interacción supone una pérdida estadísticamente significativa de poder predictivo del modelo. En caso de obtenerse un resultado positivo de forma global, se pasaría a valorar cada término de interacción por separado.

En todas las pruebas realizadas el grado de significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1. Análisis de la efectividad y tolerabilidad del tratamiento con acetato de glatirámero en pacientes con esclerosis múltiple recurrente en condiciones de práctica clínica habitual

Un total de 298 pacientes de la unidad de enfermedades desmielinizantes del Hospital Clínico San Carlos estaban o habían estado en tratamiento con acetato de glatirámero (AG). De éstos, 234 eran formas EM-RR, 53 EM-SP, 9 EM-PP y 2 sujetos carecían de información (Figura 8).

Los 9 pacientes EM-PP en tratamiento con AG recibían dicho fármaco tras solicitud de uso compasivo.

Los pacientes EM-SP tratados con AG, estaban con dicho tratamiento, a pesar de ser una indicación formalmente fuera de ficha técnica, por haber presentado actividad clínica en los dos años anteriores, o por ser formas EM-RR con conversión a forma EM-SP después de haberse comenzado el AG.

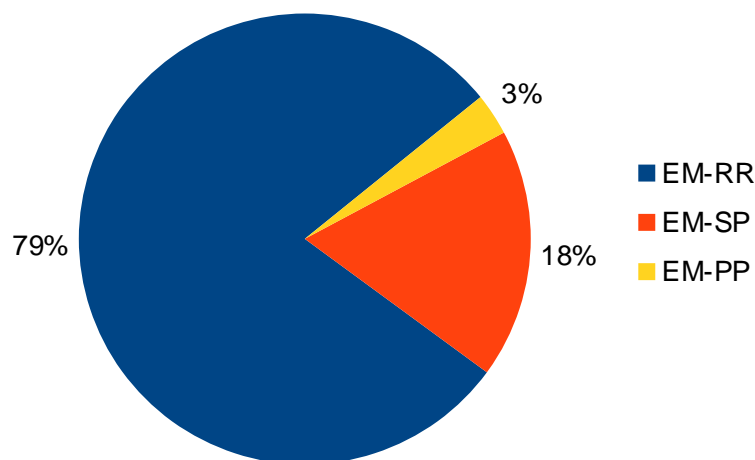


Figura 8. Distribución de las diferentes formas clínicas de EM.

De los 287 pacientes EM-RR y EM-SP, 37 fueron descartados del análisis: 16 por llevar menos de dos años de tratamiento, 10 por pérdida del seguimiento o incumplimiento terapéutico, 5 por abandono precoz del acetato de glatirámico por efectos secundarios (1,7%) y 6 mujeres por deseos de gestación. (Figura 9).

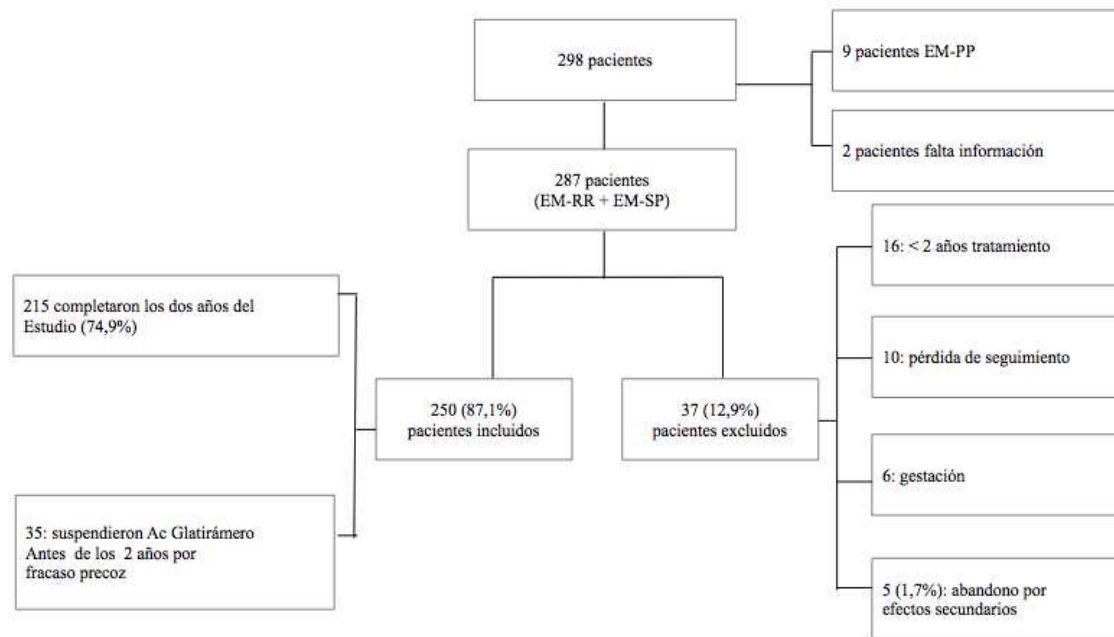


Figura 9. Diagrama de la distribución de los pacientes incluidos y excluidos del estudio.

Finalmente se incluyeron 250 pacientes en el estudio (215 que cumplieron los dos años de tratamiento + 35 que suspendieron el tratamiento con AG previo a dicha fecha por fracaso terapéutico precoz). Esto significa que un 87,1% de los pacientes fueron incluidos en el estudio (92,2% de todos los posibles pacientes elegibles sin contar los que llevaban menos de dos años de tratamiento), y un 74,9% cumplieron los dos años de tratamiento.

De esta muestra de 250 pacientes, 204 (81,6%) eran formas EM-RR, y 46 (18,4%) eran sujetos con EM-SP. 137 eran pacientes naïve, 31 habían cambiado el IFN por reacciones adversas o intolerancia, 45 procedían de tratamiento previo con IFN que había sido suspendido por ineficacia, 27 habían sido tratados previamente con mitoxantrona, 3 con azatioprina, y por último 7 con natalizumab. Por lo tanto, 168 pacientes, un 67,2% recibían Acetato de Glatirámico como primera línea de tratamiento, y 82, un 32,8%, tras fracaso de IFN o tras suspensión de fármacos inmunosupresores. (Figura 10).

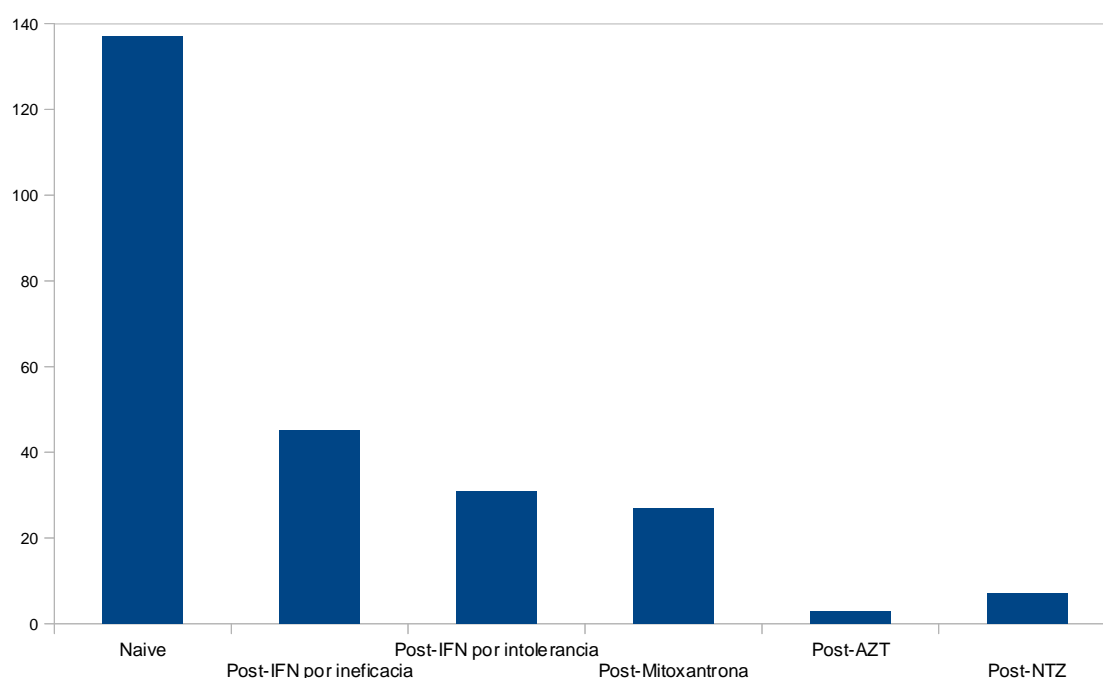


Figura 10. Distribución de los tratamientos previos al acetato de glatirámico en la muestra de nuestros pacientes.

Dentro del grupo de tratamiento con AG como 1ª línea, la mayoría eran formas EM-RR (92,9%), y solo había 12 pacientes EM-SP (8 naïve y 4 tras suspender IFN por efectos secundarios). Por otra parte, en el grupo de 2ª línea existía una proporción semejante de pacientes EM-RR (58,5%) y EM-SP (41,5%). (Tablas 1 y 2).

AG 1ª línea	Forma clínica	Nº (%)
Naïve	EM-RR	129 (76,8)
	EM-SP	8 (4,8%)
	Total	137 (81,5%)
Post-IFNβ por intolerancia/RAM	EM-RR	27 (16,%)
	EM-SP	4 (2,4%)
	Total	31 (18,5%)
Total	EM-RR	156 (92,9%)
	EM-SP	12 (7,1%)
	Total	168

Tabla 1. Composición del subgrupo de tratamiento con acetato de glatirámico en 1ª línea.

AG 2ª línea	Forma clínica	Nº (%)
Post-IFNβ por ineficacia	EM-RR	38 (46,3%)
	EM-SP	7 (8,5%)
	Total	45 (54,9%)
Post-Mitoxantrona	EM-RR	5 (6,1%)
	EM-SP	22 (26,8%)
	Total	27 (32,9%)
Post-Azatioprina	EM-RR	3 (3,7%)
	EM-SP	0 (0%)
	Total	3 (3,7%)
Post-Natalizumab	EM-RR	2 (2,4%)
	EM-SP	5 (6,1%)
	Total	7 (8,5%)
Total	EM-RR	48 (58,5%)
	EM-SP	34 (41,5%)
	Total	82

Tabla 2. Composición subgrupo de tratamiento con acetato de glatirámico en 2ª línea.

Respecto a las características clínicas y demográficas basales el 66% (165) eran mujeres, y el 34% (85) hombres. La edad media al inicio de la enfermedad era de 31,1 años (rango: 14,1 – 60,4; IC 95%: 29,9- 32,2), semejante para hombres (30,9; IC 95%: 28,9 – 33) y para mujeres (31,1; IC 95%: 29,7 – 32,4).

La edad media al inicio del tratamiento con AG fue de 36,9 años (IC 95%: 35,8 – 38,1), con 5,1 años de media desde el primer síntoma en los pacientes EM-RR (IC 95%: 4,4 – 5,8), y mayor en el caso de los pacientes EM-SP (media 9,9 años; IC 95%: 8,3 – 11,5). (Tabla 3). ($p<0,0001$).

Sexo (F:M; %)	Edad al inicio EM (años; media)	Tiempo hasta el inicio del AG (años; media) (IC 95%)		Valor p de la diferencia
66%-34%	31,1	EM-RR	5,1 (4,4 – 5,8)	$p<0,0001$
		EM-SP	9,9 (8,3 – 11,5)	

Tabla 3. Datos epidemiológicos basales de la muestra del estudio.

La EDSS media al inicio del tratamiento era de 2,4 (IC 95%: 2,2 – 2,6; rango 0 – 7), y la mediana de 2 (IC 95% 2 – 2,5), con una marcada diferencia entre los grupos EM-RR (media de 1,8; IC 95%: 1,7 – 2; mediana de 2 IC 95%: 2 – 2; rango 0 – 4) y EM-SP (media de 4,9; IC: 95%: 4,6 – 5,4; mediana de 5,5; IC 95%: 4 – 6; rango 2,5 – 7) ($p<0,0001$).

La TAR durante los dos años previos al inicio del estudio fue de 0,98 en la muestra completa, también con diferencias significativas entre los grupos EM-RR (TAR de 1,1; IC 95%: 0,9 – 2) y EM-SP (TAR de 0,6, IC 95%: 0,4 – 0,8) ($p<0,0001$).

Si se realiza el mismo análisis agrupando según el tipo de tratamiento de AG (1ª línea frente a 2ª línea) se encontraron también diferencias significativas en la variable EDSS basal, pero no en la tasa de brotes en los 2 años anteriores al estudio. (Tabla 4).

El tratamiento con AG redujo la TAR a 0,49 (0,55 en pacientes EM-RR y 0,24 en pacientes EM-SP) tras finalizar el primer año del estudio, lo que supuso una disminución media de la TAR del 49,6% (IC 95%: 37,4% - 61,8%). Durante el 2º año del estudio, el tratamiento con AG mantenía esta efectividad con una TAR de 0,33 (0,29 en sujetos EM-RR, y 0,48 en pacientes EM-SP). Es decir, se observaba una reducción frente a la TAR de los 2 años previos del estudio del 66,5% (IC 95%: 54,9% - 78,1%) (Tabla 4).

	EDSS basal media (IC 95%)	P de la diferencia	EDSS basal mediana (IC 95%)	TAR 2 años previos (IC 95%)	P de la diferencia
Toda la muestra	2,4 (2,2 – 2,6)		2 (2 – 2,5)	0,98 (0,89 – 1,1)	
EM-RR	1,8 (1,7 – 2)	p<0,001	2 (2 – 2)	1,1 (0,9 – 2)	p<0,001
EM-SP	4,9 (4,6 – 5,4)		5,5 (4 – 6)	0,6 (0,4 – 0,8)	
AG 1ª línea	1,8 (1,6 - 2)	p<0,001	2 (1,5 – 2)	0,9 (0,8 – 1)	P=0,052
AG 2ª línea	3,5 (3,2 – 3,9)		3,5 (3 – 45)	1,1 (0,9 – 1,3)	

Tabla 4. Datos clínicos basales de la muestra del estudio.

Comparando los resultados tras el 1^{er} y 2º año de tratamiento con AG, se observaba una tendencia a una mayor protección frente a la aparición de nuevos brotes a medida que aumentaba el tiempo de exposición al acetato de glatirámico, aunque dicha diferencia no alcanzó la significación estadística, dado el solapamiento entre los intervalos de confianza de las estimaciones de la reducción de la TAR del 1^{er} (37,4-61,8%) y 2º año (54,9%-78,1%).

Si analizamos la variación global de la EDSS tras los dos años del estudio no se encontró un aumento significativo respecto a la basal en la muestra global, en los pacientes EM-RR, ni en los pacientes de uso de AG en 1ª línea, pero sí en los subgrupos EM-SP y 2ª línea (Tabla 5).

	Disminución TAR 1^{er} año (IC 95%)	Disminución TAR 2º año (IC 95%)	Aumento EDSS final (media) (p)	
Toda la muestra	49,6% (37,4 – 61,8%)	66,5% (54-9 – 78,1%)	0,1 (p=0,7)	
			EM-RR	0,03 (p=0,6)
			EM-SP	0,4 (p<0,001)
			1ª línea	0,03 (p=0,7)
			2ª línea	0,25 (p=0,014)

Tabla 5. Datos clínicos de respuesta terapéutica al acetato de glatirámico.

Si analizamos los resultados terapéuticos del tratamiento con AG con el criterio de respuesta utilizado en este trabajo (ausencia de progresión de la discapacidad y como máximo 1 brote en los dos años del estudio) la efectividad se puede considerar media-alta, con un porcentaje de respuesta del 64,3% (160 pacientes) (IC 95%: 58 – 70%) (Tabla 6).

De los 88 pacientes no respondedores, hubo 32 sujetos (36,4%) debido a progresión de la EDSS sin existencia de brotes, 22 (25%) que tuvieron brotes y progresión de la EDSS, y 34 (38,6%) que solo tuvieron brotes, sin progresión de la EDSS. (Tabla 5). De los 56 pacientes que presentaron brotes, 28 (un 50% del total) presentaron los brotes durante el 1^{er} año de tratamiento, y solo 20 (un 35,7% del total) recayeron durante el 2^o año del tratamiento. (Tabla 6).

Si diferenciamos entre el tipo de forma clínica, se observaba que los pacientes EM-RR obtenían unos datos de respuesta ligeramente mejores que los sujetos EM-SP (67,5% frente a 50% respectivamente), pero que no alcanzaba una diferencia estadísticamente significativa. De la misma manera, al dividir las causas del fracaso terapéutico se obtenían resultados semejantes en ambos grupos. (Tabla 6).

	Respuesta. Nº (%) (IC 95%)	Fracaso terapéutico por brotes. Nº (%)	Fracaso terapéutico por progresión EDSS. Nº (%)	Fracaso terapéutico por brotes + progresión EDSS. Nº (%)
Toda la muestra	160 (64,3%) (58-70%)	34 (38,6%) - 1 ^{er} año: 50% - 2 ^o año: 35,7%	32 (36,4%)	22 (25%)
EM-RR	137 (67,5%) (61 – 74%)	23 (34,8%)	27 (40,9%)	16 (24%)
EM-SP	23 (50%) (35 – 65%)	11 (50%)	5 (22,7%)	6 (27,3%)

Tabla 6. Datos de efectividad del acetato de glatirámico y causas de la falta de respuesta terapéutica.

Por último, el AG fue en general bien tolerado. De los 287 pacientes iniciales, tan solo 6 pacientes (1,7%) tuvieron que suspender el tratamiento debido a efectos secundarios: 3 por dolor-reacciones locales, 2 por reacciones alérgicas y 1 por necrosis cutánea.

De los 250 pacientes incluidos en el estudio, 238 (95,2%) se mantuvieron libres de efectos adversos significativos, y solo 12 refirieron síntomas, que fueron leves y no impidieron continuar con el tratamiento (5 lipodistrofias, 5 reacciones inmediatas post-infusión, y 2 reacciones urticariformes leves autolimitadas). Por último, hubo un caso de intento autolítico, que no se consideró como reacción adversa al AG.

7.2. Análisis de la asociación de los factores clínicos (sexo, edad de inicio, tipo de tratamiento previo, EDSS basal y número de brotes en los 2 años anteriores al inicio del tratamiento) con la respuesta al acetato de glatirámico

La composición de los grupos de pacientes respondedores y no-respondedores era semejante en cuanto a la distribución de sexo, edad de inicio de la enfermedad, edad de inicio del tratamiento con AG y forma clínica. (Tabla 7).

	Sexo (F) (%)	Edad Inicio (media; años)	Edad AG (media; años)	% de EM-RR (IC 95%)
NR	66,3 %	29,3	36,1	74% (65 -83%)
R	65,6%	31,9	37,4	86% (80 – 91%)

Tabla 7. Características epidemiológicas basales de los grupos no respondedor (NR) y respondedor (R).

Respecto a la EDSS basal, número de brotes previos y tipo de tratamiento previo al AG (1ª línea frente 2ª línea) tampoco se encontraron diferencias significativas en la muestra global, aunque el grupo de pacientes respondedores presentaban una tendencia hacia una puntuación más baja en la EDSS basal, menor TAR y mayor uso del AG como primera línea de tratamiento. (Tabla 8).

	EDSS basal (media) (IC 95%)	TAR 2 años previos al inicio del estudio (media) (IC 95%)	Tratamiento Ac. Glatirámico como 1ª línea (%) (IC 95%)
NR	2,8 (2,4 – 3,1)	1,1 (0,9 – 1,3)	56% (46 – 67%)
R	2,2 (1,9 – 2,5)	0,9 (0,8 - 1)	73% (66 – 80%)

Tabla 8. Características clínicas basales de los grupos no respondedor (NR) y respondedor (R).

Al realizar una regresión logística con todas las variables anteriores, para elaborar un modelo predictivo de la respuesta terapéutica, se encontró que la forma clínica y el número de brotes totales en los dos años previos al inicio del tratamiento con AG se asociaban de una forma estadísticamente significativa con la predicción de la respuesta en los pacientes de nuestra muestra. Según nuestros resultados los pacientes EM-SP tenían un riesgo ausencia de respuesta 2,81 veces mayor que los pacientes EM-RR (IC 95% 1,4 – 5,6). Igualmente, por cada brote en los 2 años previos el riesgo de fracaso terapéutico se multiplicaba por 1,34 (IC 95%: 1,1 – 1,6).

Si realizamos dicha estimación de posibles variables predictivas clínicas de respuesta de manera independiente para los pacientes EM-RR se obtiene también que cada brote previo aumenta el riesgo de fracaso terapéutico (OR: 1,3; IC 95%: 1 – 1,64). Por otra parte, si dicho análisis parcial lo realizamos para el subgrupo EM-SP, el modelo no encontraba ninguna variable asociada a la probabilidad de respuesta.

Si nos centramos en el subgrupo EM-RR y los estadísticos de su modelo de regresión logística y construimos una tabla de índices pronósticos combinando la EDSS basal y el

número de brotes en los dos años previos, tomando como base un paciente con 1 solo brote y EDSS inicial de 0, la probabilidad de respuesta al acetato de glatirámico sería la siguiente. (Tabla 9).

EDSS basal	Nº brotes en los dos años anteriores					
	1	2	3	4	5	6
0	82,1%	77,1%	71,2%	64,5%	57,2%	49,5%
1	78,6%	73,1%	66,5%	59,4%	51,8%	46,1%
1,5	76,8%	70,8%	64,1%	56,7%	49,1%	41,5%
2	74,8%	68,5%	61,6%	54,1%	46,4%	38,9%
2,5	72,7%	66,2%	59%	51,4%	43,7%	36,3%
3	70,5%	63,7%	56,3%	48,6%	41,1%	33,8%
3,5	68,2%	61,1%	53,6%	45,9%	38,3%	31,5%
4	65,8%	58,5%	50,9%	43,3%	35,9%	29,2%
4,5	63,3%	55,9%	48,2%	40,6%	33,5%	27%
5	60,7%	53,2%	45,5%	38%	31,1%	24,9%
5,5	58,2%	50,5%	42,8%	35,5%	28,8%	22,9%
6	55,5%	47,8%	40,2%	33,1%	26,7%	21,1%

Tabla 9. Probabilidades de respuesta según EDSS basal y Nº brotes en los 2 años previos.

La prueba de bondad de ajuste de Hosmer y Lemeshow puso de manifiesto una excelente calibración de los modelos de regresión logística, sin diferencias estadísticamente significativas entre los valores pronosticados de respuesta y los datos reales observados en la muestra. (Tabla 10).

Modelo	Chi-cuadrado	p
Muestra: completa (EM-RR + EM-SP) Variables predictivas: N° brotes 2 años previos; Forma clínica	0,014	0,993
Muestra: EM-RR Variables predictivas: N° brotes 2 años previos	<0,0001	0,999
Muestra: EM-RR Variables predictivas: N° brotes 2 años previos; EDSS basal	2,079	0,955

Tabla 10. Valores del parámetro de bondad de ajuste de Hosmer y Lemeshow para los diferentes modelos de regresión logística.

No obstante, y a pesar de la adecuada calibración del modelo, su poder de discriminación fue solo moderado, con un porcentaje total de clasificaciones correctas de 63,5% (IC 95%: 56,2 – 70.7%). (Figura 11)

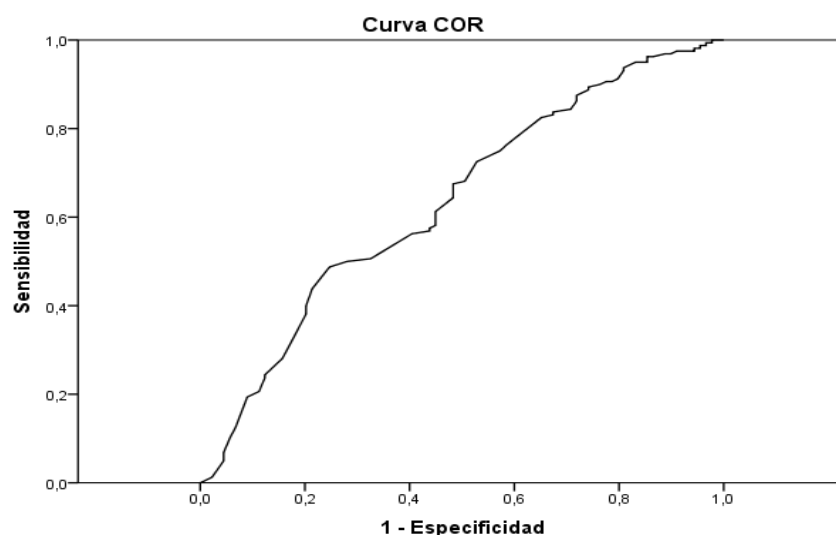


Figura 11. Curva COR del modelo de regresión logística con las variables predictivas EDSS basal y número de brotes totales en los dos años anteriores al inicio del estudio.

Si representamos en una tabla los valores de sensibilidad y especificidad para diferentes puntos de cortes de la probabilidad de paciente respondedor, se observa que ningún valor consigue cifras adecuadas de manera conjunta para ambos parámetros. (Figura 12)

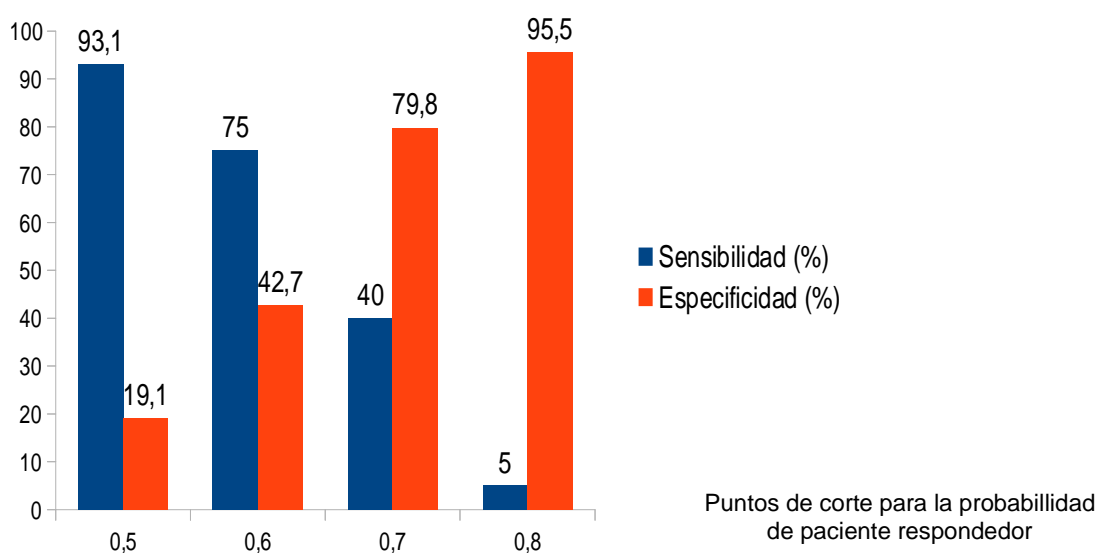


Figura 12. Valores sensibilidad y especificidad para diferentes puntos de corte de probabilidad de paciente respondedor.

7.3. Análisis de la asociación del HHV-6 con la respuesta al acetato de glatirámico

De los 250 pacientes de la población original, se disponía de muestras de serología para el virus HHV-6 con dos años de seguimiento, recogidos basalmente, a los 6, 12, 18 y 24 meses, en 85 de ellos.

Los descriptivos clínicos y demográficos de esta muestra eran semejantes a los de la muestra completa de 250 pacientes, sin diferencias significativas ni en la composición de las variables clínicas y epidemiológicas, ni en el porcentaje de pacientes respondedores y no-respondedores. (Tabla 11).

Grupo	Sexo (F) (%)	Edad Diagnóstico (años) (media) (IC 95%)	Inicio Tto (años) (media) (IC 95%)	EDSS basal (media) (IC 95%)	TAR (media) (IC 95%)	R (%) (IC 95%)	% EMRR
Muestra completa	66%	31,1 (29,9-32,2)	36,9 (35,8-38,1)	2,4 (2,2-2,6)	0,98 (0,89-1,1)	64,3% (58-70%)	81,6%
Submuestra HHV-6	70,6%	31,7 (29,8-33,6)	37,3 (35,4-39,2)	2,3 (2-2,7)	0,96 (0,84-1,1)	75,3% (65,9-84,7)	83,5%

Tabla 12. Variables descriptivas de la submuestra para el análisis de la respuesta terapéutica al acetato de glatirámico con el HHV-6.

Tras valorar la relación del cambio en los títulos de IgG frente al HHV-6 y la respuesta terapéutica al AG encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el cambio de IgG a los 2 años de tratamiento y la respuesta terapéutica al acetato de glatirámico.

Por razones de estratificación más adecuada de los cambios de las cifras de anticuerpos se calculó el porcentaje del cambio de los niveles de IgG, y se categorizó en 5 grupos (1: no disminución ó aumento de la IgG; 2: disminución menor del 5% respecto el valor basal de la IgG; 3: disminución mayor del 5% pero menor del 10%; 4: disminución mayor del 10% pero menor del 20%; y 5: disminución mayor del 20%).

Con esta clasificación, el factor por el que se multiplicaba el aumento de probabilidades de respuesta positiva al pasar de un grupo a otro era de 1,51 (IC 95%: 1,07 – 2,12, $p=0,045$). De esta manera un paciente del grupo 5 tendría 6,028 veces más probabilidades de estabilidad clínica que un paciente sin disminución de los valores de IgG.

Si analizamos dicha asociación para cada subgrupo de forma clínica, se observaron resultados semejantes en el grupo EM-SP (OR: 2,77; IC 95%: 1-7,87, p ; 0,026).

Sin embargo, en la muestra EM-RR se encontró una tendencia a dicha asociación, aunque el resultado no alcanzó la significación estadística (OR: 1,37; IC: 95%: 0,95-1,98, p : 0,076). (Figura 13).

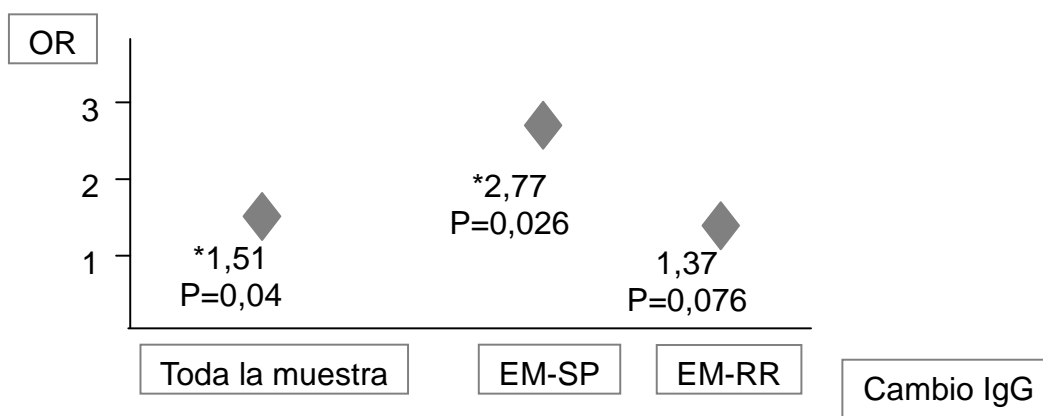


Figura 13. Odds Ratio de la asociación del cambio porcentual de los anticuerpos IgG anti-HHV-6 y la respuesta terapéutica al acetato de glatirámico. *Resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$)

También se estudió la asociación del cambio de IgG con la existencia de brotes y la progresión de la discapacidad durante los dos años del estudio.

En el caso de los brotes, la disminución de IgG producía una disminución media de las recaídas de 0,13 (IC 95%: disminución de 0,01 a 0,25; $p=0,034$) (Figura 13).

En el caso de la progresión medida como EDSS se observaba una tendencia (disminución de la EDSS de 0,08 puntos), pero que no alcanzaba la significación estadística ($p=0,095$). (Figura 14).

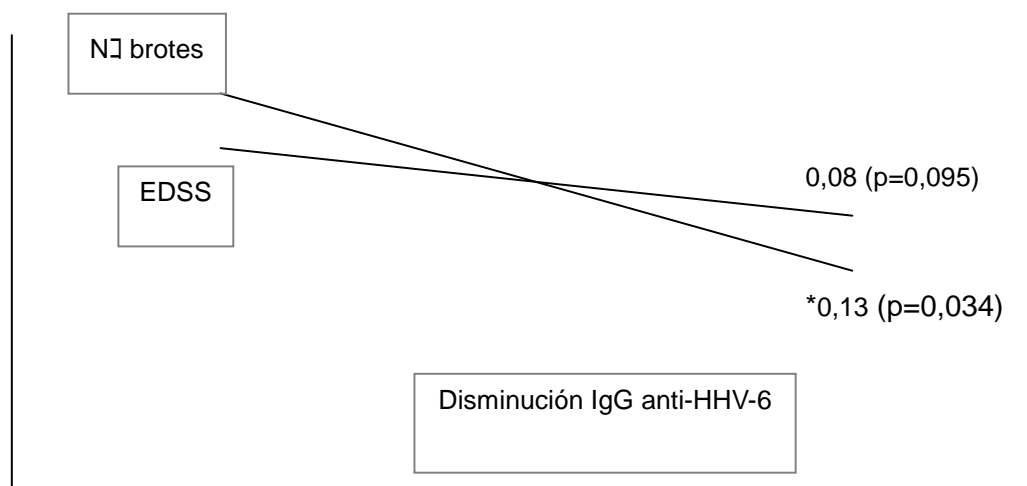


Figura 14. Disminución media de la tasa de brotes y de la EDSS por cada disminución de la IgG contra el HHV-6. *Resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Por otra parte, al estudiar la relación del cambio de los anticuerpos IgM anti-HHV-6 con la respuesta clínica al AG no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre las dos variables. Igual que con los anticuerpos IgG, los cálculos con los anticuerpos IgM se realizaron dividiendo la muestra en 5 grupos según el cambio porcentual de las cifras de IgM (Tabla 13).

	OR (IC 95%); p (toda la muestra)	OR (IC 95%); p (EM-RR)	OR (IC 95%); p (EM-SP)
Cambio porcentual IgM anti-HHV-6	1,07 (0,81- 1,41); p=0,65	1,005 (0,73 – 1,38); p=0,98	1,52 (0,72 – 3,17); p=0,27

Tabla 13. Datos de la asociación entre el cambio de anticuerpos IgM anti-HHV-6 y la respuesta al acetato de glatirámico.

Por último también se analizó la variación de las cifras de IgM con la existencia de brotes y la progresión de la discapacidad, sin encontrarse tampoco asociaciones estadísticas (Tabla 14).

	Disminución número de brotes (IC 9%); p	Cambio EDSS (IC 95%); p
Cambio porcentual IgM anti-HHV-6	-0,01 (-0,12 – 0,094); p=0,8	0,005 (-0,09 – 0,09); p=0,91

Tabla 14. Datos de la asociación entre el cambio de anticuerpos IgM anti-HHV-6 y la respuesta al acetato de glatirámico.

Igual que ocurría con el modelo de regresión logística con las variables clínicas, el ajuste del modelo con el cambio de IgG frente al HHV-6 era adecuado (X^2 prueba de bondad de ajuste de Hosmer y Lemeshow=0,478; p: 0,787).

7.4. Análisis de la asociación de las variantes alélicas del HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1 con la respuesta al acetato de glatirámico

De los 250 pacientes incluidos en el estudio se disponía de datos de HLA en 192 de ellos, de los cuales hubo 124 respondedores (64,6%), y 68 no respondedores (35,4%).

Igual que ocurría con la submuestra del HHV-6, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la muestra del HLA y la muestra original completa (Tabla 15).

Grupo	Sexo (F) (%)	Edad al Dco (años) (media) (IC 95%)	Inicio Tto (años) (media) (IC 95%)	EDSS basal (media) (IC 95%)	TAR (media) (IC 95%)	R (%) (IC 95%)	% EMRR
Muestra completa	66%	31,1 (29,9-32,2)	36,9 (35,8-38,1)	2,4 (2,2-2,6)	0,98 (0,89-1,1)	64,3% (58-70%)	81,6%
Submuestra HLA	66,1%	30,3 (29-31,5)	36,2 (35-37,5)	2,4 (2,2-2,6)	1,03 (0,9-1,3)	64,6% (57,8-71,4%)	83,9%

Tabla 15. Variables descriptivos de la submuestra para el análisis de la respuesta terapéutica al acetato de glatirámico con el HLA.

En general, las frecuencias de los diferentes alelos HLA-DR encontradas en nuestra muestra fueron semejantes a las cifras previamente descritas en poblaciones europeas (314), y como era de esperar la relación de algunos de estos alelos con la respuesta terapéutica al AG no pudo ser analizada, dada su baja representación en estas poblaciones y en nuestra muestra. Estos alelos fueron el HLA-DR9, DR10 y DR12, presentes tan solo en 1, 2 y 3 pacientes (Tabla 16).

HLA	Frecuencia en nuestra muestra (%)	Frecuencia población europea (%)
DR1	9,2	11,4
DR3	14,1	13,5
DR4	11,5	16,9
DR6	14,6	12,5
DR7	14,2	14,9
DR8	3,2	2,3
DR9	0,3	0,9
DR10	0,5	0,8
DR11	5,5	8,6
DR12	0,8	1,2
DR15	21,4	15,6
DR16	4,6	1,2

Tabla 16. Distribución de las frecuencias alélicas HLA-DR en nuestra muestra y población europea

Encontramos una asociación estadísticamente significativa del alelo HLA-DR11 con la respuesta al AG. La presencia de al menos una copia de dicho gen aumentaba la probabilidad de respuesta positiva 5,6 veces (IC 95%: 1,26 – 24,9, $p=0,006$). (Figura 15).

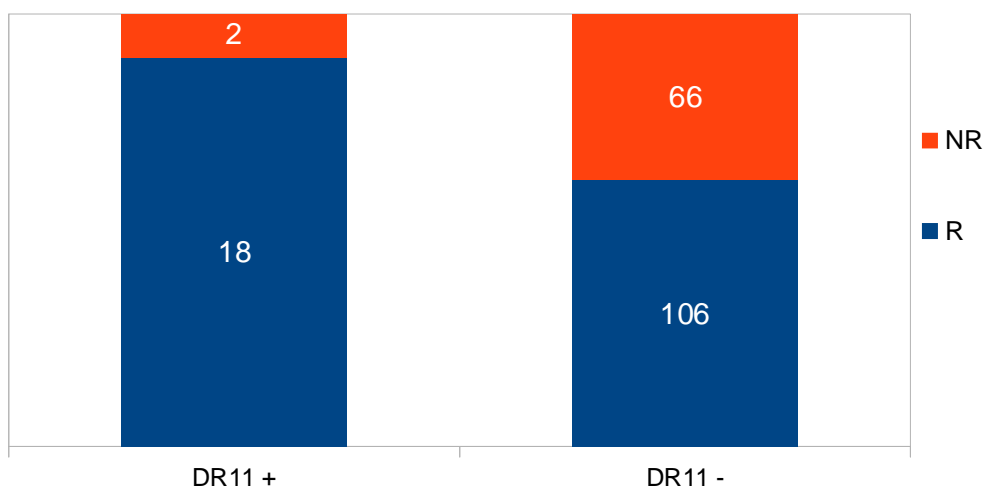


Figura 15. Distribución de pacientes Respondedores (R) y No-Respondedores (NR) en función del alelo HLA-DR11

Tan solo un paciente era homocigoto para dicho alelo HLA-DR11, por lo que no se pudieron realizar posteriores cálculos para investigar un posible efecto aditivo de dicho gen sobre la efectividad terapéutica del AG.

Por otra parte, el HLA-DR11 está descrito que se encuentra en fuerte desequilibrio de ligamiento con los alelos 0501 del HLA-DQA1 y 0301 del HLA-DQB1. De hecho, el 100% de los pacientes de nuestra muestra con alelo DR11 tenían asociados estos genes 0501 y 0301 en sus respectivos loci. Por dicho motivo tampoco se pudo realizar ningún análisis adicional sobre la respuesta en función de diferentes haplotipos según los genes HLA-DQA1 y HLA-DBQ1.

El resto de los alelos del HLA-DR no mostró asociación con la respuesta terapéutica al AG. Los resultados, con la OR, Intervalo de confianza al 95% y el valor p de significación se muestran en la tabla 17.

HLA	OR (Respuesta)	IC 95%	p
DR1	0,61	0,28 - ,129	0,19
DR3	0,84	0,44 – 1,63	0,62
DR4	1,75	0,81 – 3,75	0,14
DR6	0,99	0,51 – 1,91	0,97
DR7	0,95	0,49 – 1,84	0,87
DR8	1,57	0,48 – 5,14	0,44
DR15	0,71	0,39 – 1,29	0,26
DR16	1,25	0,37 – 4,23	0,71

Tabla 17. Asociaciones del HLA-DR con la respuesta terapéutica al acetato de glatirámico.

El poder predictivo de la respuesta al AG en función del alelo HLA-DR11, obtiene un valor de clasificaciones correctas totales pequeño (55,8%, IC 95%: 47,5 – 64%). (Figura 16).

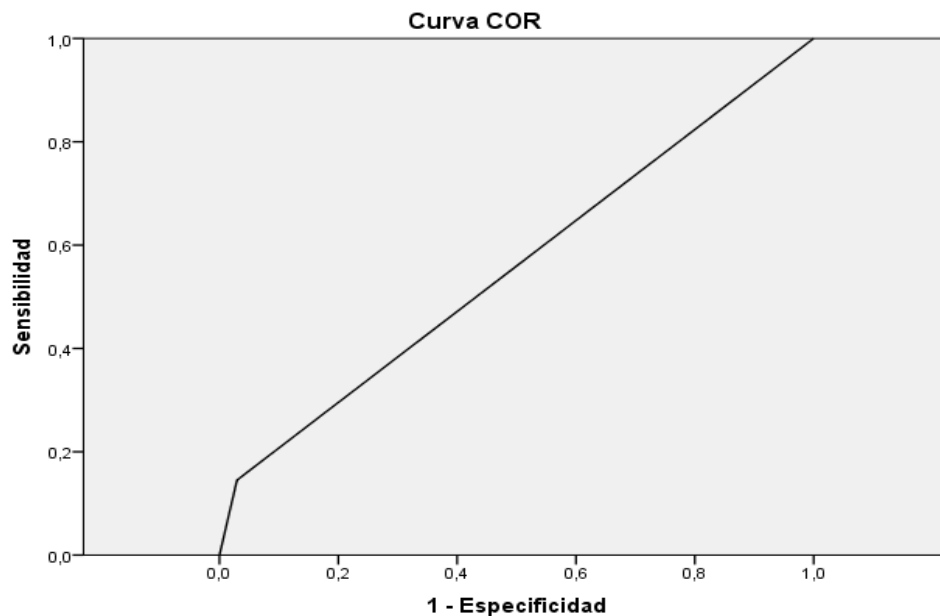


Figura 16. Curva COR del modelo predictivo con las variables HLA-DR11, brotes totales durante los dos años anteriores y forma clínica.

Sin embargo, esto se debe a que un elevado número de pacientes HLA-DR11- son también respondedores (61,6%), aunque la probabilidad de respuesta positiva al AG en caso de HLA-DR11+ resulta, por sí solo, muy elevada (90%).

Si elaboramos una nueva tabla de índices pronósticos según la presencia o ausencia de HLA-DR11 y las variables clínicas número de brotes totales en los dos años anteriores y EDSS inicial obtenemos los siguientes valores. (Tabla 18).

		HLA-DR11+				HLADR11-			
EDSS	Brotos	1	2	3	4	1	2	3	4
0		96,5	95,3	93,7	91,6	81,4	76,2	70,1	63,1
1		95,5	93,9	91,9	89,3	77	71,1	64,2	56,8
1,5		94,9	93,2	90,9	87,9	74,6	68,2	61,1	53,5
2		94,2	92,3	89,7	86,5	72	65,3	57,9	50,2
2,5		93,5	91,3	88,4	84,8	69,3	62,2	54,7	46,9
3		92,6	90,2	87	83,1	66,4	59,1	51,4	43,6
3,5		91,6	88,9	85,4	81,1	63,4	55,9	48,1	40,4
4		90,6	87,5	83,7	78,9	60,3	52,6	44,8	37,3

Tablas 18. Índices pronósticos de la probabilidad de respuesta en función del HLA-DR11, N° brotes totales en los dos años anteriores al inicio del acetato de glatirámico y EDSS inicial.

7.5. Análisis de la asociación de los SNPs-GWAS con la respuesta al acetato de glatirámico

De los 250 de la muestra original, se disponía de datos de los SNPs en 182 pacientes.

Igualmente que con las submuestras anteriores del HHV-6 y HLA, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas con la composición de la muestra original completa (Tabla 19).

Grupo	Sexo (F) (%)	Edad al Dco (años) (media) (IC 95%)	Inicio Tto (años) (media) (IC 95%)	EDSS basal (media) (IC 95%)	TAR (media) (IC 95%)	R (%) (IC 95%)	% EMRR
Muestra completa	66%	31,1 (29,9-32,2)	36,9 (35,8-38,1)	2,4 (2,2-2,6)	0,98 (0,89-1,1)	64,3% (58-70%)	81,6%
Submuestra SNPs	67%	30,6 (29,4-31,9)	36,4 (35,1-37,8)	2,5 (2,2-2,7)	1 (0,9-1,1)	65,4% (58,4-72,4%)	81,9%

Tabla 19. Variables descriptivas de la submuestra para el análisis de la respuesta terapéutica al acetato de glatirámico con los SNPs.

De los 42 SNPs analizados se encontró una asociación estadísticamente significativa con la respuesta al AG en 9 de ellos. En 7 de estos 9, la eficacia terapéutica estaba asociada con un determinado genotipo, en 1 la asociación se encontraba tanto con el genotipo como con la presencia de un alelo, y en el último SNP la respuesta se relacionaba tan solo con uno de sus alelos (Anexo I).

Además, había otros 5 SNPs en los que se hallaba una clara tendencia de asociación con la respuesta al AG, aunque no alcanzaba la significación estadística. (Anexo II).

El resto de los SNPs no se correlacionaban con el grado de eficacia al AG. (Anexo III).

En la tabla 20 se resumen todos los SNPs estudiados, junto con su gen propuesto, funciones de dicho gen y el grado de asociación con la respuesta terapéutica al AG.

SNP (gen propuesto)	Asociación	OR (IC 95%)	P	Funciones
rs10201872 (SP140)	N			Regulación sistema inmune y transcripción
rs10466829 (CLECL1)	T	GG. 0,45 (0,21-1,03)	0,056	Molécula coestimuladora linfocitos T. Favorece diferenciación a Th2 y producción IL-4
rs11129295 (EOMES)	N			Diferenciación linfocitos T-CD8. Expresión aumentada en presencia de TGB-β e IL-4
rs11154801 (MYB)	N			Factor de transcripción. Diferenciación y proliferación progenitores hematopoyéticos. Especial importancia mantenimiento respuesta Th2
rs11810217 (EVI5)	A	CT. 2,2 (1,17-4,18)	0,013	Oncogen. Regulación de la mitosis
	T	CC. 0,57 (0,31-1,05)	0,068	
rs12212193 (BACH2)	A	G. 013 (0,09-0,19)	<0,0001	Maduración células B y producción de Ig's; Formación células Treg; Disminución células Th1, Th2 y Th17 efectoras
rs12368653 (CYP27B1)	N			Citocromo p450, familia 27, subfamilia B, polipéptido 1. Síntesis Vitamina D3 activa
rs12466022	A	CC. 0,5 (0,26-0,98)	0,041	Gen no conocido
	T	AA. 1,95 (0,99-3,83)	0,052	
	T	A. 1,74 (0,03-3,26)	0,062	
rs1250550 (ZMIZ1)	N			Factor de transcripción. No se conoce su función
rs13192841	N			Gen no conocido

SNP (gen propuesto)	Asociación	OR (IC 95%)	P	Funciones
rs13333054 (IRF8)	T	CT. 0,52 (0,26-1,05)	0,065	Factor de transcripción de la familia IFN-I
rs1335532 (CD58)	N			Ligando de CD2. Favorece la unión APC – linfocito T
rs140522 (SCO2)	A	AA. 0,28 (0,11-0,72) AG. 2,32 (1,21-4,43)	0,006 0,01	Proteína de ensamblaje de la citocromo C oxidasa
rs1520333 (IL7)	N			Maduración progenitores linfoides
Rs17066096 (IL22RA2)	A T	AG. 0,5 (0,27-0,94) AA. 1,74 (0,94-3,22)	0,031 0,079	Receptor soluble de la IL-22. Acciones antiinflamatorias al antagonizar la función de la IL-22
rs17174870 (MERKT)	N			Protein-kinasa. Regula diversas funciones celulares. Destacan las acciones antiinflamatorias por inhibición de los receptores Toll-like
rs1738074 (TAGAP)	N			GTPasa. Activación de los linfocitos T
rs2019960 (PVT1)	T	CC. 0,64 (0,57-0,72)	0,069	Factor de transcripción. Relacionado con c-myc
rs2119704 (GALC)	N			Galactocerebrosidasa. Metaboliza la galactosylceramida, uno de los principales lípidos de la mielina

SNP (gen propuesto)	Asociación	OR (IC 95%)	P	Funciones
rs2243123 (IL12A)	N			Subunidad alfa de la IL12. Necesaria para la inducción de IFN-gamma independiente de linfocitos T, y para la diferenciación de Th1 y Th2
rs2248359 (CYP24A1)	T	TT. 0,47 (0,21-1,06)	0,066	Degradación Vitamina D
	T	CT. 1,86 (0,99-3,47)	0,05	
rs2283792 (MAPK1)	N			Protein-kinasa que actua como factor de transcripción. Regula diversos procesos celulares. A nivel inmunológico se ha observado disminución CD4 y CD8
rs2293370 (TMEM39A)	N			CD80. Presente en las APC. Media la unión con los linfocitos T durante la presentación antigénica. Su ligando es el CD28
rs2300603 (BATF)	N			Elaboración y mantenimiento de la respuesta inmune (linfocitos Th17, Thf, CD8, B, y células dendríticas)
rs2303759 (CD37)	A	GT. 2,01 (1,03-3,96)	0,041	Presente en linfocitos B. Media las interacciones Linfocito B-T
rs2546890 (IL12B)	N			Subunidad beta de la interleuquina inflamatoria IL-12.
rs3118470 (IL2RA)	N			Subunidad alfa del receptotr de IL-2. Regulación proliferación linfocitos T y B. Diana del fármaco Daclizumab
rs4410871 (MYC)	N			Protooncogen. Regulación de la división celular

SNP (gen propuesto)	Asociación	OR (IC 95%)	P	Funciones
rs4613763 (PTGER4)	N			Receptor 4 de la prostaglandina E. Acciones anti-inflamatorias
rs4648356 (MMEL1)	N			Metaloproteasa. Degradación de neuropéptidos
rs4902647 (ZFP36L1)	N			Factor de transcripción. Regulación células T y B y respuesta a factores de crecimiento
rs669607	N			Gen no conocido
rs7200786 (CLEC16A)	N			Presente en linfocitos B, NK y células dendríticas. Asociada con diversas enfermedades autoinmunes
rs7238078 (MATL1)	A	GT. 2,29 (1,12-4,68)	0,022	Activación linfocitos T y B a través del NF-KB
	T	TT. 0,52 (0,27-1,01)	0,053	
rs7522462 (KIF21B)	A	AA. 0,09 (0,01-0,85)	0,01	Transporte axonal
	T	A. 0,63 (0,36-1,1)	0,085	
rs7595037 (PLEK)	A	CC. 0,39 (0,18-0,86)	0,017	Diferentes acciones. Agregación plaquetaria y coagulación, organización citoesqueleto, diferenciación células hematopoyéticas, señalización y tráfico celular
	T	CT. 1,86 (0,99-3,5)	0,052	
rs7923837 (HHEX)	N			Producción células B y anticuerpos

SNP (gen propuesto)	Asociación	OR (IC 95%)	P	Funciones
rs802734 (THEMIS)	T	CT. 1,8 (0,93-3,48)	0,078	Maduración y selección linfocitos T
rs8112449 (TYK2)	N			Tirosin-kinasa. Regulación de la vía de señalización de IFN-I, IFN-II y citocinas IL-6, IL-10, IL-12 e IL-23
rs874628 (MPV17L2)	N			Función desconocida
rs9282641 (CD86)	N			Molécula co-estimuladora de los linfocitos T. Actúa conjuntamente con CD80
rs949143 (ARL6IP4)	N			Funciones de splicing

Tabla 20. Asociación de los 42 SNPs estudiados con la respuesta terapéutica al acetato de glatirámico. A: Asociado; T: Tendencia a la asociación; N: No asociado.

El poder clasificatorio de estos 9 SNPs para predecir la probabilidad de respuesta al AG fue nuevamente moderado, aunque mejor que en el caso de las variables clínicas o HLA, con un total de clasificaciones correctas de 76,4% (IC: 69,6% - 83,3%). (Figura 17). Pero igual que ocurría con las variables anteriores tampoco conseguía valores de sensibilidad y especificidad adecuados de forma conjunta. (Figura 18).

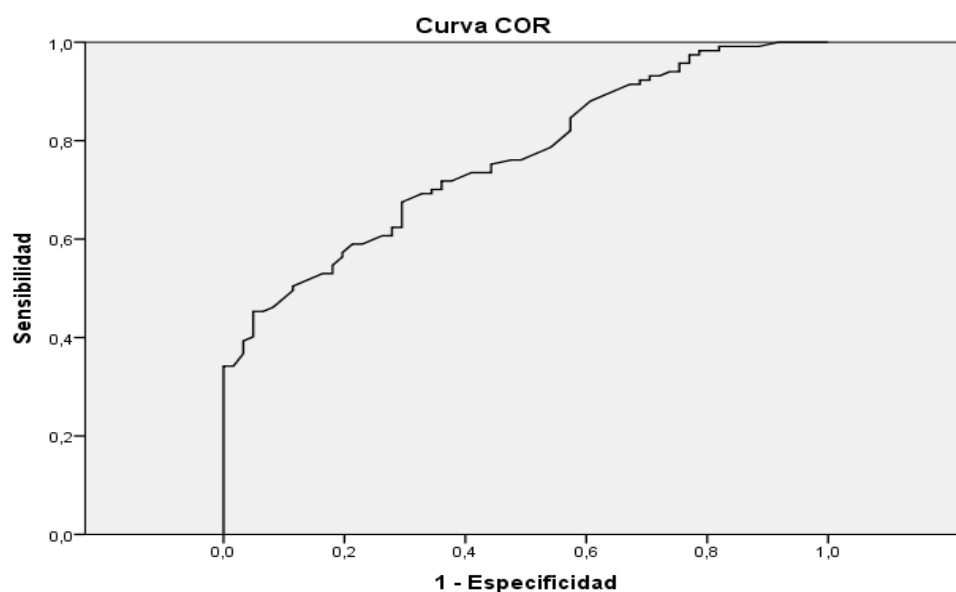


Figura 17. Curva COR del modelo predictivo con los 9 SNPs asociados con la respuesta al acetato de glatiramero.

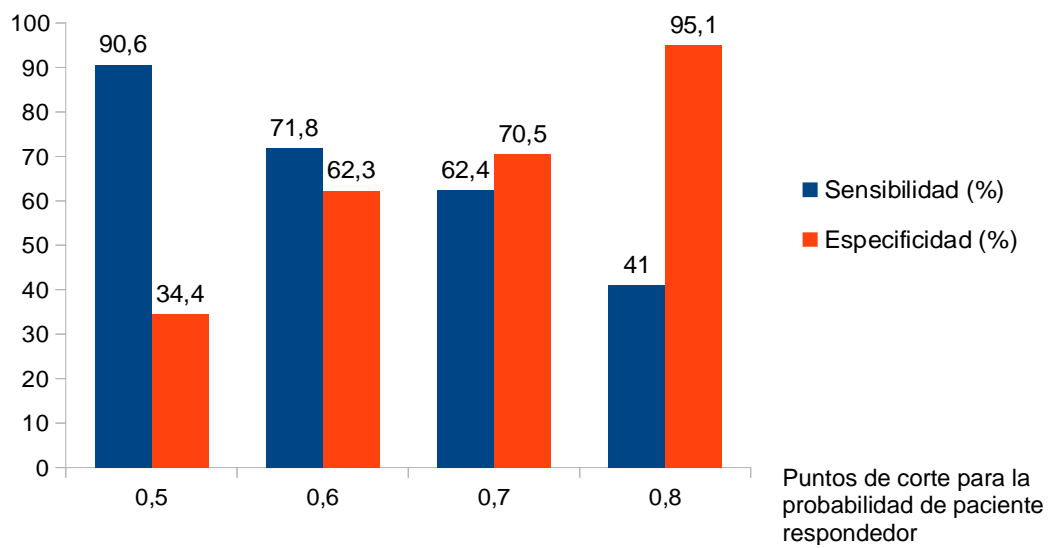


Figura 18. Valores sensibilidad y especificidad para diferentes puntos de corte de probabilidad de paciente respondedor con el modelo de los 9 SNPs asociados estadísticamente con la respuesta al acetato de glatirámico.

7.6. Análisis de las interacciones entre los alelos HLA, SNPs-GWAS y HHV-6 sobre la respuesta al acetato de glatirámero

De los 250 pacientes de la muestra original incluidos en el estudio se disponía de datos de todas las variables en 70 de ellos.

Igualmente que con las submuestras anteriores, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas con la composición de la muestra original completa (Tabla 21).

Grupo	Sexo (F) (%)	Edad al Dco (años) (media) (IC 95%)	Inicio Tto (años) (media) (IC 95%)	EDSS basal (media) (IC 95%)	TAR (media) (IC 95%)	R (%) (IC 95%)	% EMRR
Muestra completa	66	31,1 (29,9-32,2)	36,9 (35,8-38,1)	2,4 (2,2-2,6)	0,98 (0,89-1,1)	64,3 (58-70%)	81,6
Submuestra interacciones	68,6	31,6 (29,5-33,8)	37,4 (35,3-39,5)	2,3 (2-2,7)	0,94 (0,8-1,1)	78,6 (68,7-88,4)	82,9

Tabla 21. Variables descriptivas de la submuestra para el análisis de las interacciones de las diferentes variables asociadas con la respuesta terapéutica al acetato de glatirámero.

Al estimar las posibles interacciones entre la variación de los valores de los anticuerpos IgG anti-HHV6 y los SNPs asociados con la predicción de respuesta al AG, se encontró un resultado estadísticamente significativo (chunk test $p=0,047$).

Analizando cuáles eran los SNPs implicados en esta interacción se halló un resultado positivo para el rs12466022 (gen no conocido) ($p=0,039$) y rs11810217 (gen EVI5 ($p=0,04$)). (Tabla 22).

Interacción HHV6 y SNP's	P
*HHV-6 / rs_11810217 gen EVI5	*0,04
HHV-6 / rs_2212193 gen BACH2	0,42
*HHV-6 / rs_12466022 Gen no conocido	*0,039
HHV-6 / rs_140522 gen SCO2	0,11
HHV-6 / rs_17066096 gen IL22RA2	0,304
HHV-6 / rs_2303759 gen CD37	0,056
HHV-6 / rs_7238078 gen MATL1	0,106
HHV-6 / rs_7522462 gen KIF21B	0,99
HHV-6 / rs_7595037 gen PLEK	0,088

Tabla 22. Valores de significación de los términos de interacción del cambio de IgG anti-HHV6 y SNPs

El resultado de la interacción del SNP del gen EVI5 no fue valorable, ya que su estimación obtenía resultados inestables sin límite superior del intervalo de confianza, y, por lo tanto, se desestimó como posible factor de interacción.

Por otra parte, el SNP rs12466022 sí confirmó su efecto modificador de la asociación de los cambios de las cifras de IgG anti-HHV6 con la respuesta al AG. La OR de respuesta al AG en los sujetos en los que se reducían los anticuerpos anti-HHV6 se multiplicaba de forma global por 1,51 (IC 95%: 1,07 – 2,12, $p=0,045$). Esa probabilidad de respuesta era realmente mayor en los sujetos con el genotipo CC de dicho SNP (OR: 2,66; IC 95% 1,14 – 6,17; $p=0,023$), mientras que desaparecía en los sujetos con genotipos AA y AC (OR: 0,953; IC 95%: 0,54 – 1,69; $p=0,87$). (Figura 19).

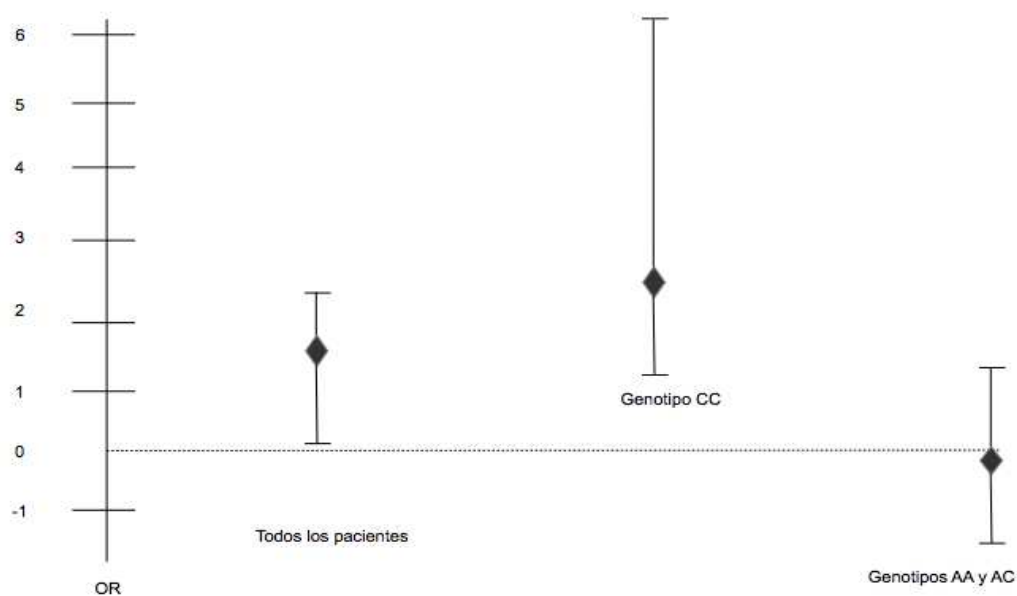


Figura 19. Modificación de la OR de respuesta relacionada con la disminución de los anticuerpos IgG anti-HHV6 en función del polimorfismo del SNP rs12466022.

No se detectaron interacciones del efecto de los diferentes SNPs entre sí. (Tabla 23).

Tampoco se hallaron interacciones entre la variación de las cifras de anticuerpos IgG anti-HHV6 y los diferentes alelos HLA-DR (chunk test $p=0,62$). (Tabla 24).

Por último, no se pudieron estudiar las interacciones entre el HLA-DR11 y los SNPs por cuestiones estadísticas debido al pequeño número de pacientes HLA-DR11+ de esta submuestra (7 sujetos), y todos ellos respondedores.

Interacción SNPs	P chunk test
rs_11810217 gen EVI5 / SNPs	0,527
rs_2212193 gen BACH2 / SNPs	0,989
rs_12466022 Gen no conocido / SNPs	0,827
rs_140522 gen SCO2 / SNPs	0,538
rs_17066096 gen IL22RA2 / SNPs	0,709
rs_2303759 gen CD37 / SNPs	0,905
rs_7238078 gen MATL1 / SNPs	0,605
rs_7522462 gen KIF21B / SNPs	0,795
rs_7595037 gen PLEK / SNPs	0,618

Tabla 23. Valores de significación de los términos de interacción entre los diferentes SNPs.

Interacción HHV-6 y HLA-DR	P
HHV-6 / HLA-DR1	0,79
HHV-6 / HLA-DR3	0,19
HHV-6 / HLA-DR4	0,57
HHV-6 / HLA-DR6	0,63
HHV-6 / HLA-DR7	0,82
HHV-6 / HLA-DR8	0,44
HHV-6 / HLA-DR11	1
HHV-6 / HLA-DR15	0,38
HHV-6/HLA-DR16	0,47

Tabla 24. Valores de significación de los términos de interacción del cambio de IgG anti-HHV6 y HLA-DR

El poder clasificatorio del modelo definitivo, incluyendo los datos clínicos (Nº brotes en los dos años anteriores, EDSS basal, forma clínica), el alelo HLA-DR11, y los 9 SNPs detectados en este estudio obtenía un valor muy elevado (AUC: 82,2%; IC 95%: 71,9 – 92,4). (Figura 20).

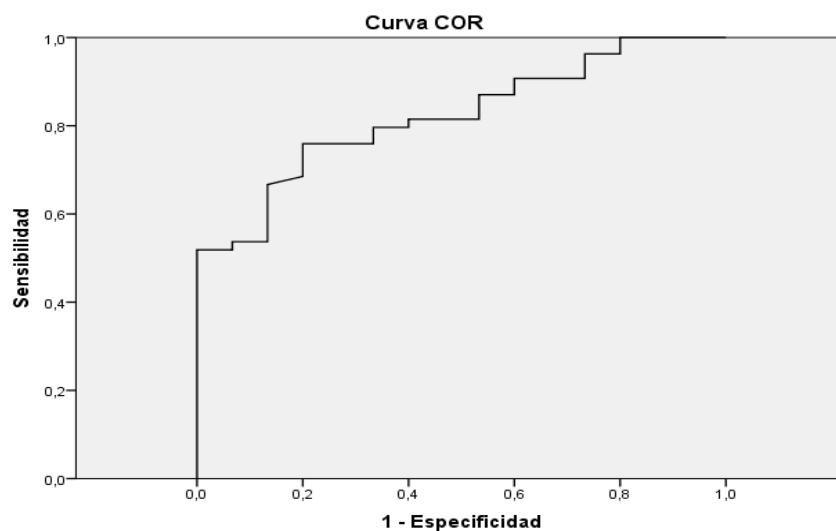


Figura 20. Curva COR del modelo completo con todas las variables predictivas clínicas, SNP's y HLA-DR11.

Igualmente, si se elige un umbral de probabilidad de respuesta al acetato de glatirámico del 75% para considerar un paciente como respondedor, se obtienen unos valores de sensibilidad y especificidad adecuados, con valores del 75,9% y 80% respectivamente.

Con la utilización de estas variables pronósticas, hasta un 63,8% (IC 95%: 52,1 – 75,4%) de los pacientes con EM alcanzarían esta probabilidad de respuesta igual o superior al 75%.

8. DISCUSIÓN

8.1. Análisis de la efectividad y tolerabilidad del tratamiento con acetato de glatirámico en pacientes con esclerosis múltiple recurrente en condiciones de práctica clínica habitual

Nuestro estudio recoge una muestra amplia de 298 pacientes tratados con AG. De dicha muestra inicial, finalmente 250 pacientes fueron incluidos en el estudio. Esto significa que un 87,1% de los pacientes iniciales, y un 92,3% de los pacientes elegibles (es decir, sin contar aquellos que no llevaban 2 años de tratamiento), fueron analizados. Un 74,9% de la muestra inicial completaron los dos años de tratamiento con AG, y 35 pacientes, aunque no completaron los dos años de tratamiento, también fueron incluidos por haber presentado un fracaso terapéutico precoz. Solo hubo 10 pacientes que no pudieron ser analizados por pérdida del seguimiento.

Estos elevados porcentajes de inclusión y de cumplimiento, y el escaso número de pacientes de los que se perdió la información, garantizarían un alto grado de validez interna de los datos del estudio.

Igualmente, las características epidemiológicas y clínicas de nuestra población se asemejan en gran medida, y reproducen los datos de los ensayos clínicos pivotaes (138,139,152), lo cual también apoya la validez externa de los resultados obtenidos en nuestro trabajo.

La mayoría de los pacientes incluidos en esta investigación se podrían considerar los pacientes ideales para valorar el grado de eficacia del AG, ya que se trataba mayoritariamente de formas EM-RR puras (81,6%), con una moderada tasa de brotes en los años previos (TAR=1,1 brotes/año), un grado de discapacidad pequeño (EDSS basal

media de 1,8), que recibían el AG como primera línea terapéutica (67,2%: 137 pacientes naive y 31 tras cambio del IFN β por intolerancia), y con un corto-medio intervalo de tiempo desde la aparición de los primeros síntomas hasta el inicio del tratamiento inmuno-modulador (5,1 años).

Además, sobre esta muestra, se añadían también un número importante de pacientes que representan circunstancias habituales en la práctica clínica diaria, y que nos permitiría profundizar en el conocimiento de la efectividad del AG en dichas condiciones menos controladas.

Así, había 85 pacientes (34,1%) con EDSS basales entre 3 – 7, pacientes con mayor tiempo desde el inicio de la enfermedad hasta el comienzo del tratamiento con AG (media de 9,9 años para los sujetos EM-SP), ó un 32,8% de individuos que recibían el AG como segunda línea tras fracaso de IFN- β (45 pacientes) ó fármacos inmunosupresores (37 casos).

Por último, aunque formalmente no está aprobado el tratamiento con AG en pacientes EM-SP, en nuestra muestra había 46 sujetos (18,4%) con esta forma clínica. La utilización de dicho tratamiento es razonable desde el punto de vista clínico. De hecho, y como veremos a continuación, el AG resultó efectivo no solo en EM-RR, sino también en los pacientes EM-SP.

Por un lado, varios estudios con AG en pacientes con EM-SP y EM-PP encontraban mejoría en algunos parámetros, aunque no alcanzaban la significación estadística. Análisis post-hoc de uno de estos trabajos revelaban un posible efecto protector del AG con una progresión clínica más lenta en los pacientes tratados frente a lo que habían recibido placebo, especialmente en varones (315). En otro de estos estudios se encontraron diferencias significativas para algunos objetivos secundarios, como la

disminución de la progresión de 0,5 puntos en la EDSS, aunque no para el objetivo primario que valoraba la progresión como aumento de la EDSS de 1 ó 1,5 puntos (137).

Por otra parte, los pacientes con esta forma clínica siguen presentado actividad inflamatoria con la consiguiente aparición de brotes. En concreto, nuestros pacientes con EM-SP tuvieron una tasa de recaídas los 2 años previos al inicio del estudio de 0,6 brotes/año. En este sentido estudios con IFN β , fármaco equiparable al AG en su eficacia (146–148), han demostrado beneficio del tratamiento inmunomodulador en estos pacientes (153–156).

Por último, los pacientes con esta forma clínica se encuentran en muchas ocasiones en tratamiento con otros fármacos para la EM y, o bien dichas terapias fracasan, o bien es conveniente cambiarlas para disminuir sus posibles efectos secundarios, como por ejemplo el caso del incremento de la espasticidad causada por los IFN- β en este grupo de sujetos (316–318). En este sentido, de los 46 pacientes EM-SP de nuestra muestra, un 82,6% (38 casos) recibían el AG como segunda línea o tras cambio del IFN- β por intolerancia, frente al 36,7% que recibían el AG por estos motivos en el grupo de pacientes EM-RR (75 de 204 pacientes).

En términos globales el AG fue un fármaco efectivo. Se produjo una reducción de la tasa de brotes tras un año de tratamiento de 1,1 a 0,49 brotes/año (reducción del 49,6%), tanto en formas clínicas EM-RR como EM-SP. Dicha reducción se mantenía en el segundo año de tratamiento (TAR de 0,33 brotes/año). Comparando directamente los resultados tras el primer y segundo año de tratamiento, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, aunque sí se observaba una tendencia a una mayor

reducción de la tasa de brotes durante el segundo año de tratamiento. Dicho resultado podría interpretarse de dos maneras:

- 1) Que el inicio del efecto terapéutico del AG es progresivo, observándose una mejoría desde el primer año. Dicha respuesta se incrementaría y se consolidaría con un mayor tiempo de exposición. En este sentido se sabe que los efectos del AG, y también de otros fármacos inmunomoduladores como el IFN- β , no son inmediatos. A nivel radiológico, el control sobre el componente inflamatorio y la reducción de captación de contraste y de lesiones nuevas no se aprecia hasta después del sexto mes de tratamiento (139). Y a nivel clínico, se acepta generalmente un cumplimiento de entre seis y doce meses de medicación estable como tiempo mínimo para valorar adecuadamente la respuesta terapéutica. En este mismo ensayo clínico, las diferencias con respecto al grupo placebo en la disminución de la tasa de recaídas aparecían a partir del tercer trimestre del estudio (139). En estudios de extensión se observaba que los efectos terapéuticos del AG se consolidaban y aumentaban a partir de dicho momento (319), y se mantenían estables a largo plazo. (320,321).
- 2) Que en realidad la tasa de brotes con el AG se estabiliza a partir del primer año de tratamiento. En este caso la leve reducción de la tasa de brotes observada en nuestro estudio estaría falseada por la selección natural de los pacientes con mejor respuesta terapéutica al eliminar aquellos pacientes más agresivos que tuvieran un fracaso terapéutico precoz. Este sesgo es un hecho que se ha observado en algunos estudios de extensión, y que dificulta la valoración de la efectividad mantenida y a largo plazo de estos tratamientos. Así, por ejemplo en el estudio de extensión del ensayo clínico de los grupos europeo y canadiense, el

tiempo medio libre de brotes era de 3,5 años para aquellos pacientes que continuaban con AG, mientras que era menor para los pacientes que habían suspendido el tratamiento (1,3 años para los que habían cambiado a IFN- β y 2,9 años para aquellos que no estaban recibiendo terapia modificadora de la enfermedad) (322).

En nuestro estudio, el porcentaje de retirada precoz del AG por curso agresivo de la enfermedad fue escaso (14%, 35 pacientes), y solo 14 de ellos antes del primer año. Igualmente, el tiempo transcurrido hasta dicho fracaso terapéutico fue de media 13,7 meses, por encima del primer año de tratamiento. Por dichos motivos, y en mi opinión, el efecto observado en nuestro estudio sobre la tendencia hacia una mayor reducción de la TAR tras el primer año de tratamiento sería el reflejo de un mayor efecto terapéutico auténtico asociado con el tratamiento prolongado. En este sentido, otros estudios de seguimiento con AG, como por ejemplo el estudio de extensión a 6 años del grupo americano, encontraba resultados semejantes, con una tasa media de recaídas de 0,42, dato muy semejante a nuestros resultado, y con una reducción progresiva de dicha cifra que alcanzaba un valor de 0,21 al sexto año de tratamiento (323).

De todas formas, y en cualquiera de las dos situaciones, quedaría demostrado que, aunque el inicio del efecto terapéutico del AG fuera paulatino, su instauración máxima se consigue relativamente rápido, tras el primer año. Y en aquellos pacientes con una buena respuesta inicial, la efectividad se mantiene a lo largo del tiempo.

En cuanto a la estabilidad clínica medida con la EDSS se observaron datos semejantes de efectividad. Considerando toda la muestra conjuntamente, en el grupo EM-RR, y en el grupo de tratamiento con AG como primera línea terapéutica, la EDSS media se mantuvo sin cambios.

Los grupos EM-SP y los pacientes que recibían AG como segunda línea terapéutica sí tuvieron un aumento estadísticamente significativo de 0,4 y 0,25 puntos respectivamente. Estos aumentos son lógicos y esperables. De hecho, las formas clínicas EM-SP se caracterizan por un empeoramiento progresivo, sin relación con brotes de su situación neurológica. En cuanto a los pacientes de nuestra muestra tratados con AG como segunda línea terapéutica, muchos de ellos eran formas EM-SP, y por otro lado, estos pacientes que precisan cambios de medicación suelen presentar una enfermedad más agresiva y proceden de fármacos más potentes como es el caso de la Mitoxantrona o el Natalizumab.

En términos globales, si analizamos la efectividad del AG con el criterio de respuesta utilizada en este estudio se confirma el buen grado de efectividad de este tratamiento, con un porcentaje de pacientes respondedores del 64,3% (IC 95% entre el 58% y el 70%), datos semejantes a otros estudios observacionales (324–326).

Si diferenciamos según el tipo de forma clínica, se observaba que el AG era efectivo tanto en formas EM-RR (67,5% de pacientes respondedores) como en formas EM-SP (50%), aunque se observaba una tendencia a una mayor efectividad en los pacientes EM-RR, lo cual es razonable teniendo en cuenta que son pacientes con menor componente degenerativo.

Por último, en cuanto a la seguridad del AG, encontramos resultados semejantes, o incluso mejores a los ya conocidos, y no se encontró ningún problema importante de tolerabilidad. En general el porcentaje de retirada del AG debido a cualquier motivo oscila entre el 2 y el 10% (138,139,324,325). En nuestro estudio, de los 287 pacientes iniciales, tan solo 6 pacientes (1,7%) tuvieron que suspender el tratamiento debido a efectos secundarios: 3 por dolor-reacciones locales, 2 por reacciones alérgicas y 1 por

necrosis cutánea. Esta pequeña tasa de abandonos encontrada en nuestro estudio se debe probablemente a la gran labor de educación y prevención realizada por nuestra enfermería.

Igualmente, de los 250 pacientes incluidos en el estudio, 238 (95,2%) se mantuvieron libres de efectos adversos significativos. Solo 12 refirieron síntomas, que fueron leves y no impidieron continuar con el tratamiento. Además, estas reacciones fueron, en su mayoría, las ya conocidas de tipo cutáneo local y de reacción sistémica a la perfusión (5 lipodistrofias, 5 reacciones inmediatas post-perfusión, y 2 reacciones urticariformes leves autolimitadas).

Por lo tanto, todos estos datos, tanto de eficacia contrastada, como de elevada seguridad, suponen una garantía de unos buenos resultados del AG en la práctica clínica diaria, y refrendan su uso como una terapia consolidada y extendida en pacientes con EM.

8.2. Análisis de la asociación de los factores clínicos (sexo, edad de inicio, tipo de tratamiento previo, EDSS basal y número de brotes en los 2 años anteriores al inicio del tratamiento) con la respuesta al acetato de glatirámico

Hasta la fecha no existe un consenso sólido respecto a datos clínicos que puedan ser útiles como variables predictivas para pronosticar la respuesta al tratamiento con AG.

Por un lado, ya en los primeros ensayos clínicos se observaba que aquellos pacientes con EDSS iniciales menores tenían una tendencia hacia un menor riesgo de recaídas (137,138). De la misma manera, un meta-análisis de los tres ensayos clínicos principales con AG revelaba que la EDSS basal y el número de brotes durante los dos años previos al estudio eran factores predictivos del riesgo de brotes (327). De la misma manera, algunos estudios posteriores observacionales también han encontrado datos predictivos de la respuesta terapéutica. En uno de estos trabajos, realizado en 272 pacientes, y donde se evaluó la probabilidad de respuesta a los fármacos inmunomoduladores (AG o IFN β), se encontró que la edad mayor al diagnóstico, menores puntuaciones de la discapacidad basales y menor actividad radiológica en la RM previa aumentaban la probabilidad de efectividad del tratamiento (328).

Sin embargo, otras investigaciones no confirman estos hallazgos. Así, en un amplio estudio observacional realizado en nuestro país no se encontró asociación de ninguna variable epidemiológica (sexo, edad de inicio de la enfermedad, duración de la enfermedad y duración del tratamiento con AG), ni clínica (número de brotes en el año anterior, EDSS basal y fracaso previo de IFN- β) en la probabilidad de recidivas ni de progresión de la discapacidad (325). Otro estudio observacional llevado a cabo en Brasil tampoco encontraba asociaciones estadísticamente significativas entre variables epidemiológicas y clínicas (variación de la EDSS) y la respuesta al tratamiento (326).

Estas diferencias tienen que deberse a razones metodológicas. No obstante, y a pesar de la ausencia de una unanimidad en los resultados de diferentes trabajos parece razonable esperar una mejor evolución y una mayor efectividad del AG en aquellos pacientes con formas clínicas más leves.

En nuestro estudio, la composición de ambos grupos (Respondedores y No respondedores) fue semejante en todas las variables usadas como predictivas, por lo que no fue necesario ajustar por ninguna de estas variables a la hora de realizar los análisis estadísticos. Al calcular las posibles variables predictivas de buena respuesta terapéutica al AG se encontró una asociación con la forma clínica (mejor para las formas EM-RR que en sujetos EM-SP) y el número de brotes en los dos años previos al inicio del tratamiento. Estos datos irían en la línea de los resultados de los ensayos clínicos pivotaes y del meta-análisis de esos estudios.

En concreto, con los datos obtenidos en nuestro trabajo, si aceptamos como buena una probabilidad de respuesta terapéutica al AG del 70% o mayor, y seguimos los datos de los resultados de la tabla 10, el tratamiento sería adecuado a priori en pacientes con 1 brote previo y EDSS entre 2 y 3; pacientes con hasta 2 brotes previos y una EDSS basal entre 1 y 1,5; y por último, en pacientes con hasta 3 brotes si parten de una EDSS basal de 0.

Además, el análisis de la bondad de ajuste y los supuestos del modelo no determinó ninguna vulneración significativa de estos criterios, por lo que se puede concluir que nuestro modelo de regresión logística resultaría adecuado para estimar la asociación de las variables predictivas con la efectividad terapéutica del AG.

No obstante, hay que tener en cuenta que la exactitud diagnóstica global del modelo fue tan solo moderada (63,5%) (IC 95%: 56,2 – 70%). Si nos fijamos en los resultados de la

tabla 11, podemos ver que en ningún caso se obtienen valores elevados de forma conjunta para la sensibilidad y la especificidad.

En enfermedades graves, como la EM, la mayoría de los autores recomiendan pruebas de cribado y modelos predictivos con elevada especificidad, ya que un error puede ocasionar repercusiones importantes, con secuelas neurológicas permanentes. De esta manera se intenta asegurar que los pacientes seleccionados para un determinado tratamiento tengan una alta probabilidad de éxito, aun a expensas de descartarse pacientes que podrían haber tenido también una buena evolución con dicha terapia.

Con los resultados de nuestro estudio, y si usamos el punto de corte previo de 0,7 como probabilidad a partir de la cual se clasificaría como respondedor a un determinado paciente, la especificidad sería buena con un valor de 79,8%. Esto nos permitiría elegir con una adecuada seguridad qué pacientes no serían candidatos, a priori, al tratamiento con AG. Sin embargo, dicho modelo tendría a su vez un valor de la sensibilidad de 40%, el cual resulta excesivamente bajo, y que supondría no tratar con este fármaco a muchos pacientes susceptibles de presentar una evolución positiva con él.

Por dicho motivo, y aunque los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la hipótesis de que las formas clínicas más leves tendrían mayores probabilidades de éxito terapéutico, el uso de datos epidemiológicos y/o clínicos de manera aislada no serían suficientes para seleccionar adecuadamente el mejor tratamiento para cada paciente. Sería necesario mejorar este modelo predictivo con la incorporación de nuevas variables de tipo biomarcadores (analíticos, genéticos, serológicos y/o pruebas de neuroimagen).

8.3. Análisis de la asociación del HHV-6 con la respuesta al acetato de glatirámico

Para el análisis de dicho objetivo se contaba tan solo con 85 pacientes de los 250 iniciales. A pesar de la pérdida de información, las características de ambas muestras eran equiparables en todas las variables estudiadas, tanto a nivel epidemiológico como en los datos clínicos. Por este motivo, podemos concluir que los resultados obtenidos en la muestra parcial podrían ser extrapolables a la muestra global y a la población de pacientes con EM.

En nuestro estudio, encontramos una asociación entre la reducción de los títulos de IgG frente al HHV-6 con la respuesta al AG. Dicha relación fue de intensidad leve, con una OR para respuesta positiva de 1,507 al pasar de un grupo a otro de mayor disminución, y con un límite inferior del intervalo de confianza escasamente por encima de 1 (IC 95%: 1,07 – 2,12).

No obstante, si comparamos la probabilidad de respuesta del grupo de descenso mayor del 20% frente al grupo sin descenso de la IgG, las posibilidades de respuesta serían de hasta 6,028 veces superiores, lo cual sí supondría un dato con una intensidad de asociación más elevado y que podría tener una repercusión clínica importante.

Adicionalmente, se encontró una asociación significativa del descenso de la IgG con la disminución del número total de recaídas durante los dos años de tratamiento ($p=0,034$), aunque no con la protección frente a la progresión de la discapacidad medida con el cambio de EDSS al final de los dos años del estudio ($P=0,095$). Estos datos reforzarían la hipótesis actualmente vigente de que el efecto de los virus en la patogenia de la EM está más relacionado con la parte inflamatoria y sus consiguientes brotes, y en menor medida con el componente neurodegenerativo (89,96,102).

A pesar de dicha asociación, hay que resaltar que el efecto de la disminución de la IgG anti-HHV-6 sobre la reducción de los brotes era leve. En concreto, por cada reducción de IgG, los brotes totales descendían de media 0,13 unidades (IC 95%: 0,01 – 0,25; $p=0,034$). Este hecho justifica la asociación leve previamente presentada entre los cambios de la IgG anti-HHV-6 y la probabilidad de respuesta al AG.

Además, dado el efecto moderado de este tratamiento sobre el componente inflamatorio de la enfermedad, el AG conseguiría mejores resultados en pacientes con menores tasas de recaídas. En nuestro estudio los pacientes EM-SP tenían una TAR estadísticamente inferior a los EM-RR (0,6 versus 1,1, $p < 0,001$). Por lo tanto, esto explicaría la mayor asociación encontrada entre el descenso de las cifras de IgG con la respuesta terapéutica al AG en los sujetos con EM-SP, para los cuales la asociación fue estadísticamente significativa (OR: 2.27; IC 95%: 1-7,87, $p=0,026$), que en las formas clínicas EM-RR, en los cuales se observaba una tendencia a la asociación (OR: 1,37), pero que no alcanzaba la asociación estadística (IC 95: 0,95 – 1,98, $p=0,076$).

Esta asociación entre la evolución clínica y la modificación de la actividad del HHV-6 ya era conocida para otros fármacos. Así, existen varios trabajos que unen la respuesta terapéutica al IFN- β con la disminución de los títulos de anticuerpos anti-HHV-6 (99) y la reducción de la replicación viral medida con PCR (97).

Pero, hasta la fecha, este sería el primer trabajo en relacionar el efecto terapéutico y la respuesta clínica al AG con la modificación de los niveles de uno de los virus que podrían estar implicados en la patogenia de la EM.

Se desconoce la razón de dicho efecto, pero se podrían plantear dos posibilidades:

- 1) En primer lugar, que entre los múltiples y variados mecanismos de acción del Acetato de Glatirámico también se incluyan acciones antivirales. La manera en que el AG ejercería dicha acción antiviral sería una incógnita en este momento. En cualquier caso, la intensidad de dicho efecto sería menor que el de otros fármacos inmunomoduladores con mayor efecto antiviral. En nuestro estudio no se encontró una reducción media de las cifras globales de IgG contra el HHV-6, sino únicamente diferentes proporciones de pacientes respondedores según la disminución de los niveles de IgG. Sin embargo, trabajos realizados con el IFN- β , fármaco para el cual uno de los principales mecanismos de acción propuestos sí es un efecto antiviral, encuentran datos de asociación entre el HHV-6 y la respuesta a este tratamiento más potentes y directos. Así, en uno de estos estudios, el tratamiento con IFN- β producía una reducción de la prevalencia del HHV-6 en sangre de un 58% a un 36%, y en suero de un 18,5% a un 12,2%. Además, dicho descenso del HHV-6 se correlacionaba adecuadamente con la biodisponibilidad del IFN- β (98).
- 2) O bien que el descenso de las cifras de IgG frente al HHV-6 en los pacientes tratados con Acetato de Glatirámico no signifique una reducción directa viral, sino que indique un marcador indirecto de sus mecanismos antiinflamatorios y reguladores del sistema inmune.

En nuestro estudio, no encontramos una asociación entre el grado de respuesta terapéutica al AG y el cambio de los niveles de IgM frente al HHV-6. Este hecho, apoyaría más esta segunda opción de un efecto regulador del sistema inmune sobre la posibilidad de un efecto antiviral directo del AG. Se sabe que, los anticuerpos IgM son las inmunoglobulinas directamente relacionadas con las infecciones activas, y por lo

tanto la modificación de los valores de estos anticuerpos medirían mejor el efecto antiviral de un fármaco. De hecho, en un trabajo realizado *in vitro* para valorar el efecto antiviral del IFN- β se encontraba una asociación entre la reducción de la replicación del HHV-6, medida mediante PCR, con la disminución de la reactividad IgM contra antígenos virales (329).

Los mecanismos por los cuales el AG pudiera ejercer este efecto regulador del sistema inmune y producir la reducción de las cifras de los anticuerpos IgG no se conocen en este momento, y solo podríamos elaborar nuevas hipótesis.

En este sentido, es conocida la similitud entre la proteína U24 del HHV-6 y una secuencia de 7 aminoácidos de la MBP₉₂₋₁₀₄. Y dada a su vez la similitud entre el AG y la MBP, se podría especular que el AG bloqueara la unión del HHV-6 a las moléculas HLA-II, disminuyendo a su vez las respuestas inmunológicas contra este virus. Por un lado la reducción de la respuesta humoral quedaría reflejada en la disminución de las cifras de IgG. Y por otra parte, la reducción de la activación de células T, conseguiría el efecto terapéutico del AG, al disminuir consiguientemente la reactividad cruzada autoinmune contra la propia mielina y, de esta manera, evitar la actividad inflamatoria de la EM (81).

Por último, y dados los resultados obtenidos en este estudio sería muy interesante valorar el comportamiento de otros virus relacionados con la EM, como son el VEB y los HERV, en relación con la respuesta terapéutica al AG.

8.4. Análisis de la asociación de las variantes alélicas del HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1 con la respuesta al acetato de glatirámico

Igual que ocurría con la submuestra de los pacientes con datos de serología del HHV-6, para el análisis de las variantes alélicas del complejo HLA-II se dispuso tan solo de una parte de la población inicial de 250 sujetos, aunque en este caso la pérdida de información fue menor, ya que se pudieron analizar 192 pacientes.

En cualquier caso, igual que sucedía con la submuestra del HHV-6, la composición del grupo con datos del HLA no presentaba diferencias significativas respecto a la muestra original completa.

Resulta interesante el hallazgo de la asociación de respuesta terapéutica al AG con el HLA-DR11, no descrita hasta la fecha.

Tan solo había un paciente homocigoto para dicho alelo, por lo que no se pudo analizar si la dosis del gen pudiera tener algún efecto aditivo sobre la efectividad terapéutica del AG.

Tampoco se pudo investigar si dicho efecto se veía modificado en función de diferentes haplotipos, ya que el 100% de los pacientes portadores del HLA-DR11 eran a su vez portadores de las variantes DQA0501 y DQB0301.

En cualquier caso, según los datos encontrados en nuestro trabajo, el efecto de poseer al menos una copia de dicho alelo HLA-DR11 supondría un efecto muy intenso sobre las probabilidades de respuesta al AG. En concreto, sería el dato aislado de todos los analizados más fuertemente asociado con esta respuesta terapéutica.

Si nos fijamos en los resultados de la tabla 18, prácticamente todos los pacientes HLA-DR11+ tendrían posibilidades de éxito terapéutico por encima del 75%, con un porcentaje global de respondedor del 90%.

De confirmarse estos resultados en futuras investigaciones, la utilización de esta fácil determinación analítica sería de gran utilidad.

En base a los resultados aquí presentados, sería recomendable la realización de esta prueba previa al inicio de un tratamiento con AG.

No obstante, sigue habiendo dos problemas que le restan algo de aplicabilidad.

1. Según datos previos, tan solo, alrededor del un 8-9% de la población europea es portadora de este gen, por lo que únicamente un pequeño porcentaje de pacientes podría beneficiarse de este hallazgo.
2. Incluso en aquellos pacientes con HLA-DR11 – sigue existiendo un adecuado porcentaje de pacientes respondedores. Dicho porcentaje alcanza globalmente el 61,6%, pero oscila ampliamente según otras variables clínicas (Nº de brotes previos y EDSS basal).

Por ambos dos motivos, es necesario seguir investigando para buscar otros marcadores pronósticos y mejorar las posibilidades de respuesta en los pacientes HLA-DR11 -.

En nuestro estudio no se encontró ningún otro alelo del HLA-DR asociado con el grado de respuesta terapéutica.

En especial es de destacar la ausencia de asociación con el HLA-DR1*1501 encontrada en nuestros pacientes. Sobre dicho alelo ya se han publicado trabajos previos, con resultados dispares.

El primer estudio publicado en 2001 por Fusco C. et al (251) encontraba una asociación estadísticamente significativa entre dicho alelo y la probabilidad de respuesta al AG considerando tanto la tasa media de recaídas como el porcentaje de no respondedores (definido no respondedor como la presencia de uno o más brotes y/o aumento de la EDSS de al menos 1 punto de forma mantenida durante al menos tres meses).

Este estudio se llevó a cabo en 44 pacientes, durante un periodo de dos años, igual que nuestro trabajo. Además, las definiciones de respondedor y no respondedor fueron muy semejantes, e incluso algo más estrictas que en nuestro trabajo. Este hecho acentúa la relevancia de los hallazgos de nuestro estudio, que no encontró diferencias significativas en una muestra con mayor número de pacientes con una metodología muy parecida.

En un trabajo posterior, publicado en el año 2011 por Gross R et al (254) se volvió a replicar la asociación descrita por Fusco C. encontrando una asociación con el tiempo libre hasta la primera recaída. No obstante, el efecto encontrado fue modesto, y tan solo en los pacientes homocigotos para dicho alelo, hecho que tampoco fue demostrado en nuestro estudio, ya que no se detectaron diferencias entre homocigotos y el resto de los pacientes.

Finalmente, Tsareva K. et al (253), en un artículo publicado en 2012, tampoco encontraron dicha asociación entre la respuesta terapéutica al AG y la presencia del alelo HLA-DRB1*1501 si se estudiaba de forma individual, pero sí en el caso de analizarlo de forma combinada con polimorfismos de otros genes.

En conjunto, podríamos concluir que la asociación del HLA-DRB1*1501 con la respuesta terapéutica del AG, en caso de existir, parecería ser leve, y probablemente no explicada tan solo por dicho alelo sino de forma poligénica por su combinación con otras variantes de otros genes.

Por último y para concluir, la probable asociación encontrada en nuestro estudio entre el grado de respuesta terapéutica de este fármaco inmunomodulador y el HLA-DR11, y la posible asociación con el HLA-DRB1*1501 planteada en otros estudios, reflejaría la importancia del mecanismo de acción de este tratamiento a través de la unión al sistema HLA y la regulación de la respuesta autoreactiva inflamatoria contra la mielina.

8.5. Análisis de la asociación de los SNPs-GWAS con la respuesta al acetato de glatirámico

Igual que ocurría con las submuestras de los pacientes con datos de serología del HHV-6 y HLA, para el estudio de los SNPs no se pudieron analizar todos los pacientes de la muestra global. En este caso se dispuso de información de 182 de los 250 pacientes iniciales, por lo que la pérdida de información fue también escasa, y las composiciones de los grupos original y parcial fueron semejantes en todas sus variables.

De los 42 SNPs analizados, se encontró una relación con el grado de respuesta terapéutica al AG en 9 de ellos.

En general, el grado de asociación fue moderada. Solo 2 SNPs tuvieron un valor de la OR de 0,5 (rs12466022 (gen desconocido) y rs17066096 (gen IL22RA2)). Los otros 7 SNPs multiplicaban la probabilidad de respuesta al tratamiento con AG por más de 2 (rs11810217 (gen EVI5); rs140522 (gen SCO2); rs2303759 (gen CD37); y rs7238078 (gen MALT1)), ó la dividían por menos de 0,5 (rs12212193 (gen BACH2); rs7522462 (gen KIF21B); y rs7595037 (gen PLEK)). (Tabla 15).

Además, el poder de clasificación del modelo utilizando estos 9 SNPs obtuvo mejores parámetros de área bajo la curva (AUC) que los otros modelos que analizaban las variables clínicas y HLA.

No obstante, los valores de sensibilidad y específica siguen siendo insuficientes, ya que no superan las cifras del 75% de forma conjunta (Figura 18).

Por dicho motivo, en caso de confirmarse estas asociaciones, la determinación rutinaria de estos SNPs podría ser de gran utilidad en el ejercicio clínico diario, ya que podrían

servir como variables con un alto poder predictivo de la respuesta terapéutica, pero habría que combinarlos con el resto de datos analíticos y clínicos.

Además de estos 9 SNPs, se encontró también una tendencia a la asociación estadística con la respuesta clínica al AG en otros 5 SNPs.

Es decir, en conjunto, un total de 14 SNPs, de los 42 relacionados con el riesgo de padecer EM analizados en este estudio, presentaban alguna posible asociación con la respuesta terapéutica al AG. Este dato también resulta muy interesante, ya que genera una gran cantidad de posibles factores modificadores de la respuesta clínica que podrían ser estudiados en futuros trabajos, para confirmar su asociación, y mejorar el tratamiento de los pacientes con EM.

En general se acepta en los estudios de asociación con SNPs, que el hallazgo de un resultado positivo para una determinada variante no puede interpretarse como una relación directa con dicho SNP o con el gen de dicho SNP. En muchas ocasiones, de hecho, los SNPs así descubiertos se encuentran en regiones intrónicas del gen, con lo que no codifican para la síntesis de proteínas, y podría ser que únicamente estuvieran cumpliendo funciones reguladoras de la transcripción de ese gen u otros genes.

De igual manera, en el caso de los SNPs existe un elevado desequilibrio de ligamiento. Esto podría significar que el SNPs descubierto no tuviera nada que ver con el objeto de la investigación, sino que se heredaría en bloque con la variante genética relacionada, la cual no sería identificada.

En este sentido, de los 14 SNPs asociados estadísticamente o con tendencia a la asociación con la respuesta al AG, había 4 sin una clara relación a priori ni con el mecanismo patogénico de la EM ni con el mecanismo de acción del AG. Éstos son: el rs11810217 (gen EVI5), relacionado con la mitosis celular (264), rs2019960 (gen

PVT1), oncogén que se ha encontrado en neuroblastoma y tumores linfoproliferativos (274,275), rs7595037 (gen PLEK), presente en plaquetas (289–292), y rs12466022, cuyo gen no se conoce en el momento actual. Es de destacar, que si bien parecía existir una tendencia a la asociación del gen PVT1 con la respuesta al AG, dicha asociación no se encontró con el rs4410871, del gen MYC, que se encuentra funcionalmente relacionado con el anterior.

Aún así, los otros 10 SNPs sí que tenían algún nexo teórico con el mecanismo de acción del AG como para justificar su relación con dicha respuesta.

Entre los SNPs asociados, o con tendencia a la asociación con la efectividad al AG, se encontraron genes implicados en todos los posibles mecanismos patogénicos de la EM. Otra vez, este dato resulta de gran interés. Podría indicar, por un lado, la gran cantidad de mecanismos de acción sobre los que podría estar actuando el AG. Y por otro lado, nuevamente aportaría una gran cantidad de candidatos a la hora de seguir estudiando factores que podrían modificar la efectividad de este tratamiento.

Como es lógico, dado el componente disimmune de esta enfermedad, y el mecanismo inmunomodulador del AG, la mayoría de los SNPs se encontraban en genes relacionados de una manera u otra con la función y regulación del sistema inmunitario. En total 7 de los 10 SNPs: rs10466829 (gen CLECL1) (259,261), rs12212193 (gen BACH2) (265,267), rs13333054 (gen IRF8) (268,269), rs17066096 (gen IL22RA2) (272,273), rs2303759 (CD37) (283), rs7238078 (gen MALT1) (287) y rs802734 (gen THEMIS) (294).

De todos ellos llaman la atención especialmente 3:

- El rs12212193, del gen BACH2, por ser el SNP con la asociación más fuerte. En concreto, el alelo G presentaba una OR de respuesta al AG de 0,13 (IC 95%:

0,09 – 0,19). Dicho gen se ha propuesto relacionado con la maduración de linfocitos B, producción de inmunoglobulinas, producción de células Treg y disminución de las células efectoras Th1, Th2 y Th17. Este dato reforzaría la teoría de que uno de los principales mecanismos de acción del AG se debería a la modificación y regulación de las respuestas efectoras de células T.

- El rs 10466829 (gen CLECL1). Se observaba una tendencia a la asociación, con una menor probabilidad de respuesta para el genotipo GG (OR: 0,45; IC 95%: 0,211 – 1,03). Este gen parece favorecer la respuesta Th2 y el aumento de la secreción de IL-4. En este sentido, uno de los primeros biomarcadores serológicos propuestos como modificadores de la respuesta al AG fue precisamente los niveles de IL-4 e IFN-gamma (246–248).
- Y por último, el rs13333054, cuyo genotipo CT arrojaba una tendencia leve de asociación (OR: 0,52; IC 95%: 0,26 – 1,05). Dicho SNP se encuentra en el gen IRF8, Factor de transcripción de la familia de factores reguladores de los IFN de tipo I. Este hallazgo podría sugerir algún mecanismo común en las acciones terapéuticas del AG y el IFN-β.

También se descubrieron SNPs en genes potencialmente relacionados con el componente degenerativo de la EM, y por lo tanto nuevos posibles efectos neuroprotectores del AG. En este caso los SNP's eran el rs140522 (gen SCO2) relacionado con la producción energética mitocondrial (271), y el rs7522462 (gen KIF21B) implicado en el transporte axonal (288).

Por último, también se halló un posible punto de unión del mecanismo del AG con la regulación de la vitamina D (rs2248359, del gen CYP24A1) (276).

Para terminar, hubo 28 SNPs que no obtuvieron ninguna relación con la respuesta terapéutica al AG. Dentro de estos 28 SNPs también nos encontramos con todos los mecanismos patogénicos implicados en la EM y posibles modos de acción del AG (sistema inmune, posibles mecanismos degenerativos y de daño axonal, y metabolismo de la vitamina D).

De todos ellos, merece una mención especial el rs9282641 (CD86). Dicho gen había sido relacionado en un trabajo previo con una posible modificación de la respuesta al AG (254). En nuestro trabajo no se encontró esta asociación. Hay que indicar que en aquel artículo los SNPs analizados (rs1129055 y rs2001791) eran diferentes a los de nuestro estudio. No obstante, la falta de asociación en nuestro estudio entre el SNP rs9282641 y la respuesta terapéutica al AG, junto con la ausencia de relación de respuesta al AG, tanto en el artículo aludido como en nuestro estudio, del SNPs del gen CD80, molécula co-estimuladora de los linfocitos T relacionada funcionalmente con el CD86, reforzaría la ausencia de relación entre este gen CD86 y la efectividad del AG.

Todos estos resultados deberían ser validados en cohortes independientes, con una “N” mayor, para confirmar su posible implicación como posibles predictores en la respuesta a AG.

8.6. Análisis de las interacciones entre los alelos HLA, SNPs-GWAS y HHV-6 sobre la respuesta al acetato de glatirámico

En primer lugar, es muy destacable el hecho de no haberse encontrado interacciones entre el descenso de las cifras de IgG anti-HHV6 en los pacientes respondedores al AG y los alelos del complejo HLA-DR.

Dado la facilidad de unión del AG a las moléculas HLA (224), y que uno de los principales mecanismos de acción propuestos del AG es la modulación de las respuestas autoreactivas contra péptidos de la mielina a través de su unión al HLA-II (228,245), habría sido esperable encontrar alguna interacción entre ambas variables.

En cualquier caso, los resultados así obtenidos restarían peso a la hipótesis de que el mecanismo inmunomodulador por el cual el AG reduce los títulos de anticuerpos contra el HHV6 sea a través del antagonismo de la unión del HHV6 a dichas moléculas HLA, como se había sugerido previamente en este trabajo en el apartado 8.3, y obligarían a seguir investigando y buscando otras explicaciones.

En este sentido, resulta de interés el haberse encontrado en nuestro estudio datos que sugieren una interacción entre el descenso de los anticuerpos IgG contra el HHV-6 y uno de los SNPs asociados al riesgo de padecer EM. En concreto, la asociación entre el descenso de los valores de los anticuerpos anti-HHV6 y la respuesta terapéutica al AG era mayor en los sujetos con genotipo CC del rs12466022, mientras que desaparecía para las otras combinaciones del polimorfismo (genotipos AA y AC). Desafortunadamente, en este momento no se conoce el gen al que pertenece este rs12466022, y por lo tanto no podemos elaborar nuevas sugerencias sobre este mecanismo de acción del AG relacionado con la disminución de las cifras de anticuerpos. Sería de gran interés confirmar esta interacción encontrada en nuestro

trabajo, y descifrar las acciones del gen de este SNP, para conocer mejor los mecanismos de acción del AG.

En cuanto a las interacciones entre los diferentes SNPs-GWAS implicados en la probabilidad de respuesta terapéutica al AG, no obtuvimos ningún resultado estadísticamente significativo que apoyase dichas asociaciones. Este hecho resulta llamativo, debido a que este tipo de interacciones ya han sido descritas en trabajos previos (253). La ausencia de estas interacciones en los resultados de nuestro estudio podría deberse a que realmente los SNPs que se analizaron no estén sometidos a factores modificadores, o bien explicarse por razones metodológicas o de tamaño de la muestra. Igualmente, razones metodológicas y de tamaño muestral impidieron el análisis de interacciones entre alelos del HLA con otros genes.

En cualquier caso, esta vía de investigación resulta especialmente interesante, y se debería seguir insistiendo en ella, ya que debido a los múltiples y diversos mecanismos de acción del AG sería esperable encontrar varias de estas interacciones entre algunos de los genes involucrados en sus acciones terapéuticas, lo que permitiría profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción del AG y avanzar en el camino hacia una medicina más personalizada.

Para terminar, el modelo predictivo elaborado con todas las variables (clínicas y de laboratorio) de forma conjunta, superaba todos los demás modelos que únicamente incluían las diferentes variables de forma individual. De hecho, este modelo global era el único que conseguía obtener unos parámetros estadísticos de calidad adecuados (AUC: 82,2%; IC 95%: 71,9 – 92,4); Sensibilidad (S) 75,9 y Especificidad (E) 80%.

Sería necesario replicar estos resultados en una nueva muestra y con una “N” mayor. En caso de confirmarse los hallazgos aquí obtenidos y observar una buena fiabilidad de este

modelo predictivo sería muy aconsejable la implementación de estas determinaciones (HLA-DR11 y SNPs) como estudio complementario previo al inicio del tratamiento con AG. Aquellos sujetos con una probabilidad de respuesta pre-tratamiento superior o igual al 75% serían candidatos ideales a recibir este tratamiento inmunomodulador. Con este umbral se perderían unos pocos pacientes que se podrían haber beneficiado de dicho tratamiento (Falsos negativos: 24,1%), y, más importante, se seleccionarían equivocadamente sujetos a recibir el AG, que finalmente no resultarían respondedores, en un número todavía menor (Falsos positivos: 20%).

Hasta un 63,8% de los pacientes con EM (IC 95%: 52,1 – 75,4%) alcanzan este umbral de probabilidad de respuesta superior o igual al 75%, lo cual supone un porcentaje elevado, y por lo tanto estaríamos optimizando la elección terapéutica, y mejorando la evolución clínica de un número importante de pacientes con EM.

9. CONCLUSIONES

1. El acetato de glatirámero es un fármaco efectivo para el tratamiento de los pacientes con Esclerosis múltiple recurrente – remitente y Esclerosis múltiple secundariamente – progresiva, tanto en la reducción de la tasa de brotes, como en la estabilidad clínica medida con la escala EDSS, y en el porcentaje de pacientes respondedores en condiciones de práctica clínica habitual.
2. El acetato de glatirámero es un fármaco seguro, con un bajo porcentaje de abandonos del tratamiento por efectos secundarios, y con un bajo porcentaje de reacciones adversas, que en el caso de aparecer son leves-moderadas y predecibles.
3. La forma clínica y el número de brotes totales en los dos años previos al tratamiento podrían ser variables predictivas de la respuesta terapéutica al acetato de glatirámero, presentando un mejor pronóstico de respuesta los pacientes con Esclerosis múltiple recurrente – remitente, y aquellos con menor número de recaídas en los dos años anteriores al inicio del tratamiento.
4. Parece existir una asociación entre la reducción de las cifras de anticuerpos IgG frente al virus herpes humano tipo 6 y la respuesta terapéutica al acetato de glatirámero, especialmente a través de la disminución de la recurrencia de nuevos brotes, más que a través del control de la progresión de la discapacidad.
5. La asociación entre la reducción de las cifras de anticuerpos IgG frente al virus herpes humano 6 y la respuesta terapéutica al acetato de glatirámero es leve, lo que significaría que el mecanismo del acetato de glatirámero implicado en la reducción de dichos títulos sería solo uno de los diferentes mecanismos de acción de este tratamiento en la EM. Dicho mecanismo parece más relacionado

con un efecto regulador del sistema inmune que un efecto antiviral directo del acetato de glatirámero.

6. Parece existir una asociación entre el HLA-DR11 y la respuesta terapéutica al acetato de glatirámero, lo que apoyaría el efecto regulador de las células T autoreactivas contra la mielina como uno de los principales mecanismos de acción del acetato de glatirámero. Dicho efecto es el más intenso de todos los encontrados, aunque su gran potencialidad de aplicación práctica se ve disminuida por la baja frecuencia de este alelo en las poblaciones caucásicas.
7. Podría existir una asociación entre algunos de los SNPs asociados a la susceptibilidad a padecer EM y la respuesta terapéutica al acetato de glatirámero. Si bien dicha asociación debería ser confirmada mediante estudios de replicación en cohortes independientes.
8. La mayoría de estos SNPs se encuentran en genes relacionados con el sistema inmune, indicando la importancia de la regulación de la respuesta inmunitaria en el modo de acción del acetato de glatirámero. Pero también encontramos SNPs de genes relacionados con el transporte axonal, la producción energética mitocondrial, la vitamina D, e incluso en genes sin una relación clara con la esclerosis múltiple y en genes no conocidos en la actualidad. Este hecho justificaría un amplio y variado espectro de acciones del acetato de glatirámero.
9. En el caso de confirmarse los factores clínicos, serológicos y genéticos asociados a la respuesta terapéutica al acetato de glatirámero encontrados en este trabajo, dichas variables utilizadas de forma conjunta serían de utilidad en la práctica clínica habitual para mejorar la selección de los pacientes candidatos a dicho fármaco, y mejorar el tratamiento de la Esclerosis múltiple.

BIBLIOGRAFÍA

1. Benito-León J, Morales JM, Rivera-Navarro J, Mitchell A. A review about the impact of multiple sclerosis on health-related quality of life. *Disabil Rehabil*. 2003 Dec 2;25(23):1291–303.
2. Mitchell AJ, Benito-León J, González J-MM, Rivera-Navarro J. Quality of life and its assessment in multiple sclerosis: integrating physical and psychological components of wellbeing. *Lancet Neurol*. 2005 Sep;4(9):556–66.
3. Clavelou P, Auclair C, Taithe F, Gerbaud L. [Quality of life in multiple sclerosis]. *Rev Neurol (Paris)*. 2009 Mar;165 Suppl 4:S123–128.
4. Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. *Acta Neurol Scand*. 1975 Feb;51(2):110–36.
5. Kurtzke JF. Geography in multiple sclerosis. *J Neurol*. 1977 Apr 28;215(1):1–26.
6. Kurtzke JF, Beebe GW, Norman JE Jr. Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans: 1. Race, sex, and geographic distribution. *Neurology*. 1979 Sep;29(9 Pt 1):1228–35.
7. Kurtzke JF. Geographic distribution of multiple sclerosis: An update with special reference to Europe and the Mediterranean region. *Acta Neurol Scand*. 1980 Aug;62(2):65–80.
8. Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci*. 2001 Apr;22(2):117–39.
9. Alonso A, Hernán MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology*. 2008 Jul 8;71(2):129–35.
10. Koch-Henriksen N. The Danish Multiple Sclerosis Registry: a 50-year follow-up. *Mult Scler*. 1999 Aug;5(4):293–6.
11. Svenson LW, Warren S, Warren KG, Metz LM, Patten SB, Schopflocher DP. Prevalence of multiple sclerosis in First Nations people of Alberta. *Can J Neurol Sci*. 2007 May;34(2):175–80.

12. Houzen H, Niino M, Hata D, Nakano F, Kikuchi S, Fukazawa T, et al. Increasing prevalence and incidence of multiple sclerosis in northern Japan. *Mult Scler*. 2008 Aug;14(7):887–92.
13. Ranzato F, Perini P, Tzintzeva E, Tiberio M, Calabrese M, Ermani M, et al. Increasing frequency of multiple sclerosis in Padova, Italy: a 30 year epidemiological survey. *Mult Scler*. 2003 Aug;9(4):387–92.
14. Aladro Y, Alemany MJ, Pérez-Vieitez MC, Amela R, Conde M, Reyes MP, et al. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in Las Palmas, Canary Islands, Spain. *Neuroepidemiology*. 2005;24(1-2):70–5.
15. Koch-Henriksen N, Sorensen PS. Why does the north-south gradient of incidence of multiple sclerosis seem to have disappeared on the northern hemisphere? *J Neurol Sci*. 2011 Dec 15;311(1-2):58–63.
16. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol*. 2010 May;9(5):520–32.
17. Simpson S Jr, Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2011 Oct;82(10):1132–41.
18. Grimaldi LME, Palmeri B, Salemi G, Giglia G, D'Amelio M, Grimaldi R, et al. High prevalence and fast rising incidence of multiple sclerosis in Caltanissetta, Sicily, southern Italy. *Neuroepidemiology*. 2007;28(1):28–32.
19. Nicoletti A, Patti F, Lo Fermo S, Messina S, Bruno E, Quattrocchi G, et al. Increasing frequency of multiple sclerosis in Catania, Sicily: a 30-year survey. *Mult Scler*. 2011 Mar;17(3):273–80.
20. Pugliatti M, Solinas G, Sotgiu S, Castiglia P, Rosati G. Multiple sclerosis distribution in northern Sardinia: spatial cluster analysis of prevalence. *Neurology*. 2002 Jan 22;58(2):277–82.
21. Grimaldi LM, Salemi G, Grimaldi G, Rizzo A, Marziolo R, Lo Presti C, et al. High incidence and increasing prevalence of MS in Enna (Sicily), southern Italy. *Neurology*. 2001 Nov 27;57(10):1891–3.

22. Grønlie SA, Myrvoll E, Hansen G, Grønning M, Mellgren SI. Multiple sclerosis in North Norway, and first appearance in an indigenous population. *J Neurol*. 2000 Feb;247(2):129–33.
23. Atlas of MS database de la federación internacional de esclerosis múltiple (MSIF) [Internet]. Available from: www.atlasofms.org
24. Fernández O, Luque G, San Román C, Bravo M, Dean G. The prevalence of multiple sclerosis in the Sanitary District of Vélez-Málaga, southern Spain. *Neurology*. 1994 Mar;44(3 Pt 1):425–9.
25. Buñill E, Blesa R, Galán I, Dean G. Prevalence of multiple sclerosis in the region of Osona, Catalonia, northern Spain. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 1995 May;58(5):577–81.
26. Uria DF, Abad P, Calatayud MT, Virgala P, Díaz A, Chamizo C, et al. Multiple sclerosis in Gijón health district, Asturias, northern Spain. *Acta Neurol Scand*. 1997 Dec;96(6):375–9.
27. Sempere AP, Clavería LE, Duarte J, Coria F, Cabezas C. Multiple sclerosis in Spain. *Neurology*. 1995 Jan;45(1):202.
28. Pina MA, Ara JR, Modrego PJ, Morales F, Capablo JL. Prevalence of multiple sclerosis in the sanitary district of Calatayud, Northern Spain: is Spain a zone of high risk for this disease? *Neuroepidemiology*. 1998;17(5):258–64.
29. Benito-León J, Martín E, Vela L, Villar ME, Felgueroso B, Marrero C, et al. Multiple sclerosis in Móstoles, central Spain. *Acta Neurol Scand*. 1998 Oct;98(4):238–42.
30. Tola MA, Yugueros MI, Fernández-Buey N, Fernández-Herranz R. Prevalence of multiple sclerosis in Valladolid, northern Spain. *J Neurol*. 1999 Mar;246(3):170–4.
31. Mallada-Frechín J, Matías-Guiu J, Martín R, López-Arlandis JM, Camacho-Cuartero JM, Beltrán I, et al. [The prevalence of multiple sclerosis in the Alcoi Health district]. *Rev Neurol*. 2000 Jun 16;30(12):1131–4.
32. Casquero P, Villoslada P, Montalbán X, Torrent M. Frequency of multiple sclerosis in Menorca, Balearic islands, Spain. *Neuroepidemiology*. 2001 May;20(2):129–33.

33. Ares B, Prieto JM, Lema M, Dapena D, Arias M, Noya M. Prevalence of multiple sclerosis in Santiago de Compostela (Galicia, Spain). *Mult Scler*. 2007 Mar;13(2):262–4.
34. De Sá J. [Epidemiology of multiple sclerosis in Portugal and Spain]. *Rev Neurol*. 2010 Oct 1;51(7):387–92.
35. Fernández y Fernández O, Montalbán Gairin X. Epidemiología descriptiva de la esclerosis múltiple. En: Arbizu Urdiain T, García Merino JA., editores. *Epidemiología de la esclerosis múltiple*. Madrid: Acción médica; 2011.
36. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000 Sep 28;343(13):938–52.
37. Jersild C, Svejgaard A, Fog T. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet*. 1972 Jun 3;1(7762):1240–1.
38. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011 Aug 11;476(7359):214–9.
39. Field J, Browning SR, Johnson LJ, Danoy P, Varney MD, Tait BD, et al. A polymorphism in the HLA-DPB1 gene is associated with susceptibility to multiple sclerosis. *PLoS ONE*. 2010;5(10):e13454.
40. Patsopoulos NA, Bayer Pharma MS Genetics Working Group, Steering Committees of Studies Evaluating IFN β -1b and a CCR1-Antagonist, ANZgene Consortium, GeneMSA, International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, et al. Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Ann Neurol*. 2011 Dec;70(6):897–912.
41. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2013 Nov;45(11):1353–60.
42. Goris A, Pauwels I, Dubois B. Progress in Multiple Sclerosis Genetics. *Curr Genomics*. 2012 Dec;13(8):646–63.

43. Hernán MA, Olek MJ, Ascherio A. Geographic variation of MS incidence in two prospective studies of US women. *Neurology*. 1999 Nov 10;53(8):1711–8.
44. Gale CR, Martyn CN. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol*. 1995 Dec;47(4-5):425–48.
45. Hammond SR, English DR, McLeod JG. The age-range of risk of developing multiple sclerosis: evidence from a migrant population in Australia. *Brain*. 2000 May;123 (Pt 5):968–74.
46. Elian M, Nightingale S, Dean G. Multiple sclerosis among United Kingdom-born children of immigrants from the Indian subcontinent, Africa and the West Indies. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 1990 Oct;53(10):906–11.
47. Pierrot-Deseilligny C. Clinical implications of a possible role of vitamin D in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2009 Sep;256(9):1468–79.
48. Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2008 Mar;7(3):268–77.
49. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev*. 2010 Mar;9(5):A387–394.
50. Giovannoni G, Ebers G. Multiple sclerosis: the environment and causation. *Curr Opin Neurol*. 2007 Jun;20(3):261–8.
51. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2006 Dec 20;296(23):2832–8.
52. Hawkes CH. Are multiple sclerosis patients risk-takers? *QJM*. 2005 Dec;98(12):895–911.
53. Ramagopalan SV, Lee JD, Yee IM, Guimond C, Traboulsee AL, Ebers GC, et al. Association of smoking with risk of multiple sclerosis: a population-based study. *J Neurol*. 2013 Jul;260(7):1778–81.
54. Hedström AK, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L. Smoking and multiple sclerosis susceptibility. *Eur J Epidemiol*. 2013 Oct 22;

55. Giovannoni G, Cutter GR, Lunemann J, Martin R, Münz C, Sriram S, et al. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2006 Oct;5(10):887–94.
56. Gilden DH. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2005 Mar;4(3):195–202.
57. Christensen T. Human herpesviruses in MS. *Int MS J*. 2007 Jun;14(2):41–7.
58. Wu C, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, et al. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):513–7.
59. Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakarn H, Yosef N, Linker RA, et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):518–22.
60. Farez MF, Quintana FJ, Correale J. Sodium intake is associated with increased disease activity in MS. 29th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS). Copenhagen, Denmark; 2-5 October 2013.;
61. Munger KL, Bentzen J, Laursen B, Stenager E, Koch-Henriksen N, Sørensen TIA, et al. Childhood body mass index and multiple sclerosis risk: a long-term cohort study. *Mult Scler*. 2013 Sep;19(10):1323–9.
62. Langer-Gould A, Brara SM, Beaber BE, Koebnick C. Childhood obesity and risk of pediatric multiple sclerosis and clinically isolated syndrome. *Neurology*. 2013 Feb 5;80(6):548–52.
63. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol*. 2007 Jun;61(6):504–13.
64. Hedström AK, Olsson T, Alfredsson L. High body mass index before age 20 is associated with increased risk for multiple sclerosis in both men and women. *Mult Scler*. 2012 Sep;18(9):1334–6.
65. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernán MA, Olek MJ, et al. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA*. 2001 Dec 26;286(24):3083–8.

66. DeLorenze GN, Munger KL, Lennette ET, Orentreich N, Vogelman JH, Ascherio A. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch Neurol*. 2006 Jun;63(6):839–44.
67. Haahr S, Plesner AM, Vestergaard BF, Höllsberg P. A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2004 Apr;109(4):270–5.
68. Sundström P, Juto P, Wadell G, Hallmans G, Svenningsson A, Nyström L, et al. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology*. 2004 Jun 22;62(12):2277–82.
69. Wagner HJ, Hennig H, Jabs WJ, Siekhaus A, Wessel K, Wandinger KP. Altered prevalence and reactivity of anti-Epstein-Barr virus antibodies in patients with multiple sclerosis. *Viral Immunol*. 2000;13(4):497–502.
70. Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol*. 2006 Mar;59(3):499–503.
71. Wandinger K, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenberger P, Wagner H, et al. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology*. 2000 Jul 25;55(2):178–84.
72. Holmøy T, Kvale EØ, Vartdal F. Cerebrospinal fluid CD4+ T cells from a multiple sclerosis patient cross-recognize Epstein-Barr virus and myelin basic protein. *J Neurovirol*. 2004 Oct;10(5):278–83.
73. Rand KH, Houck H, Denslow ND, Heilman KM. Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) associated oligoclonal bands in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2000 Feb 1;173(1):32–9.
74. Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Büssow K, et al. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2005 May;115(5):1352–60.
75. Okuno T, Takahashi K, Balachandra K, Shiraki K, Yamanishi K, Takahashi M, et al. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J Clin Microbiol*. 1989 Apr;27(4):651–3.

76. Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y, et al. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*. 1988 May 14;1(8594):1065–7.
77. Yoshikawa T, Asano Y. Central nervous system complications in human herpesvirus-6 infection. *Brain Dev*. 2000 Aug;22(5):307–14.
78. Kong H, Baerbig Q, Duncan L, Shepel N, Mayne M. Human herpesvirus type 6 indirectly enhances oligodendrocyte cell death. *J Neurovirol*. 2003 Oct;9(5):539–50.
79. Dietrich J, Blumberg BM, Roshal M, Baker JV, Hurley SD, Mayer-Pröschel M, et al. Infection with an endemic human herpesvirus disrupts critical glial precursor cell properties. *J Neurosci*. 2004 May 19;24(20):4875–83.
80. Cheng W, Ma Y, Gong F, Hu C, Qian L, Huang Q, et al. Cross-reactivity of autoreactive T cells with MBP and viral antigens in patients with MS. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012;17:1648–58.
81. Tejada-Simon MV, Zang YCQ, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ. Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2003 Feb;53(2):189–97.
82. Tait AR, Straus SK. Phosphorylation of U24 from Human Herpes Virus type 6 (HHV-6) and its potential role in mimicking myelin basic protein (MBP) in multiple sclerosis. *FEBS Lett*. 2008 Aug 6;582(18):2685–8.
83. Kakimoto M, Hasegawa A, Fujita S, Yasukawa M. Phenotypic and functional alterations of dendritic cells induced by human herpesvirus 6 infection. *J Virol*. 2002 Oct;76(20):10338–45.
84. Sanders VJ, Felisan S, Waddell A, Tourtellotte WW. Detection of herpesviridae in postmortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. *J Neurovirol*. 1996 Aug;2(4):249–58.
85. Opsahl ML, Kennedy PGE. Early and late HHV-6 gene transcripts in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter. *Brain*. 2005 Mar;128(Pt 3):516–27.

86. Cermelli C, Berti R, Soldan SS, Mayne M, D'ambrosia JM, Ludwin SK, et al. High frequency of human herpesvirus 6 DNA in multiple sclerosis plaques isolated by laser microdissection. *J Infect Dis.* 2003 May 1;187(9):1377–87.
87. Goodman AD, Mock DJ, Powers JM, Baker JV, Blumberg BM. Human herpesvirus 6 genome and antigen in acute multiple sclerosis lesions. *J Infect Dis.* 2003 May 1;187(9):1365–76.
88. Fotheringham J, Jacobson S. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: potential mechanisms for virus-induced disease. *Herpes.* 2005 Jun;12(1):4–9.
89. Berti R, Brennan MB, Soldan SS, Ohayon JM, Casareto L, McFarland HF, et al. Increased detection of serum HHV-6 DNA sequences during multiple sclerosis (MS) exacerbations and correlation with parameters of MS disease progression. *J Neurovirol.* 2002 Jun;8(3):250–6.
90. Akhyani N, Berti R, Brennan MB, Soldan SS, Eaton JM, McFarland HF, et al. Tissue distribution and variant characterization of human herpesvirus (HHV)-6: increased prevalence of HHV-6A in patients with multiple sclerosis. *J Infect Dis.* 2000 Nov;182(5):1321–5.
91. Hay KA, Tenser RB. Leukotropic herpesviruses in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2000 Apr;6(2):66–8.
92. Taus C, Pucci E, Cartechini E, Fié A, Giuliani G, Clementi M, et al. Absence of HHV-6 and HHV-7 in cerebrospinal fluid in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2000 Apr;101(4):224–8.
93. Simpson S Jr, Taylor B, Dwyer DE, Taylor J, Blizzard L, Ponsonby A-L, et al. Anti-HHV-6 IgG titer significantly predicts subsequent relapse risk in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2012 Jun;18(6):799–806.
94. Alvarez-Lafuente R, García-Montojo M, De las Heras V, Bartolomé M, Arroyo R. Clinical parameters and HHV-6 active replication in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *J Clin Virol.* 2006 Dec;37 Suppl 1:S24–26.
95. Alvarez-Lafuente R, De Las Heras V, Bartolomé M, García-Montojo M, Arroyo R. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: a one-year follow-up study. *Brain Pathol.* 2006 Jan;16(1):20–7.

96. Alvarez-Lafuente R, De las Heras V, Bartolomé M, Picazo JJ, Arroyo R. Relapsing-remitting multiple sclerosis and human herpesvirus 6 active infection. *Arch Neurol*. 2004 Oct;61(10):1523–7.
97. Alvarez-Lafuente R, De Las Heras V, Bartolomé M, Picazo JJ, Arroyo R. Beta-interferon treatment reduces human herpesvirus-6 viral load in multiple sclerosis relapses but not in remission. *Eur Neurol*. 2004;52(2):87–91.
98. Garcia-Montojo M, De Las Heras V, Bartolome M, Arroyo R, Alvarez-Lafuente R. Interferon beta treatment: bioavailability and antiviral activity in multiple sclerosis patients. *J Neurovirol*. 2007 Dec;13(6):504–12.
99. Garcia-Montojo M, De Las Heras V, Dominguez-Mozo M, Bartolome M, Garcia-Martinez MA, Arroyo R, et al. Human herpesvirus 6 and effectiveness of interferon β 1b in multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol*. 2011 Aug;18(8):1027–35.
100. Garcia-Montojo M, Martinez A, De Las Heras V, Dominguez-Mozo MI, Cenit M del C, López-Cavanillas M, et al. Herpesvirus active replication in multiple sclerosis: a genetic control? *J Neurol Sci*. 2011 Dec 15;311(1-2):98–102.
101. Dominguez-Mozo MI, Garcia-Montojo M, DE Las Heras V, Garcia-Martinez A, Arias-Leal AM, Casanova I, et al. MHC2TA mRNA levels and human herpesvirus 6 in multiple sclerosis patients treated with interferon beta along two-year follow-up. *BMC Neurol*. 2012 Sep 25;12(1):107.
102. Alvarez-Lafuente R, de las Heras V, García-Montojo M, Bartolomé M, Arroyo R. Human herpesvirus-6 and multiple sclerosis: relapsing-remitting versus secondary progressive. *Mult Scler*. 2007 Jun;13(5):578–83.
103. Perron H, Geny C, Laurent A, Mouriquand C, Pellat J, Perret J, et al. Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. *Res Virol*. 1989 Dec;140(6):551–61.
104. Perron H, Lalande B, Gratacap B, Laurent A, Genoulaz O, Geny C, et al. Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet*. 1991 Apr 6;337(8745):862–3.

105. Tai AK, O'Reilly EJ, Alroy KA, Simon KC, Munger KL, Huber BT, et al. Human endogenous retrovirus-K18 Env as a risk factor in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008 Nov;14(9):1175–80.
106. Laska MJ, Brudek T, Nissen KK, Christensen T, Møller-Larsen A, Petersen T, et al. Expression of HERV-Fc1, a human endogenous retrovirus, is increased in patients with active multiple sclerosis. *J Virol*. 2012 Apr;86(7):3713–22.
107. Mameli G, Astone V, Arru G, Marconi S, Lovato L, Serra C, et al. Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6. *J Gen Virol*. 2007 Jan;88(Pt 1):264–74.
108. Perron H, Germi R, Bernard C, Garcia-Montojo M, Deluen C, Farinelli L, et al. Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Multiple Sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England). 2012 Mar 30;
109. Antony JM, van Marle G, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong VW, et al. Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci*. 2004 Oct;7(10):1088–95.
110. Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelo S, Dumon A, et al. Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology*. 2001 Sep 1;287(2):321–32.
111. Sotgiu S, Serra C, Mameli G, Pugliatti M, Rosati G, Arru G, et al. Multiple sclerosis-associated retrovirus and MS prognosis: an observational study. *Neurology*. 2002 Oct 8;59(7):1071–3.
112. Sotgiu S, Arru G, Mameli G, Serra C, Pugliatti M, Rosati G, et al. Multiple sclerosis-associated retrovirus in early multiple sclerosis: a six-year follow-up of a Sardinian cohort. *Mult Scler*. 2006 Dec;12(6):698–703.
113. Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo M, Arias-Leal A, Garcia-Martinez Á, De las Heras V, Casanova I, et al. The DNA copy number of human endogenous retrovirus-W (MSRV-type) is increased in multiple sclerosis patients and is influenced by gender and disease severity. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e53623.

114. Perron H, Lang A. The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010 Aug;39(1):51–61.
115. Christensen T. Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Rev Med Virol*. 2005 Jun;15(3):179–211.
116. Mameli G, Poddighe L, Mei A, Uleri E, Sotgiu S, Serra C, et al. Expression and activation by epstein barr virus of human endogenous retroviruses-w in blood cells and astrocytes: inference for multiple sclerosis. *PLoS ONE*. 2012;7(9):e44991.
117. Tai AK, Luka J, Ablashi D, Huber BT. HHV-6A infection induces expression of HERV-K18-encoded superantigen. *J Clin Virol*. 2009 Sep;46(1):47–8.
118. Adorini L. Immunomodulatory effects of vitamin D receptor ligands in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol*. 2002 Jun;2(7):1017–28.
119. Correale J, Ysraelit MC, Gaitán MI. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain*. 2009 May;132(Pt 5):1146–60.
120. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol*. 2007 Aug 1;179(3):1634–47.
121. Mayne CG, Spanier JA, Relland LM, Williams CB, Hayes CE. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 acts directly on the T lymphocyte vitamin D receptor to inhibit experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*. 2011 Mar;41(3):822–32.
122. Pedersen LB, Nashold FE, Spach KM, Hayes CE. 1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting chemokine synthesis and monocyte trafficking. *J Neurosci Res*. 2007 Aug 15;85(11):2480–90.
123. Spach KM, Nashold FE, Dittel BN, Hayes CE. IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2006 Nov 1;177(9):6030–7.

124. Mowry EM, Waubant E, McCulloch CE, Okuda DT, Evangelista AA, Lincoln RR, et al. Vitamin D status predicts new brain magnetic resonance imaging activity in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2012 Aug;72(2):234–40.
125. Soilu-Hänninen M, Aivo J, Lindström B-M, Elovaara I, Sumelahti M-L, Färkkilä M, et al. A randomised, double blind, placebo controlled trial with vitamin D3 as an add on treatment to interferon β -1b in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2012 May;83(5):565–71.
126. Stein MS, Liu Y, Gray OM, Baker JE, Kolbe SC, Ditchfield MR, et al. A randomized trial of high-dose vitamin D2 in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology*. 2011 Oct 25;77(17):1611–8.
127. Løken-Amsrud KI, Holmøy T, Bakke SJ, Beiske AG, Bjerve KS, Bjørnara BT, et al. Vitamin D and disease activity in multiple sclerosis before and during interferon- β treatment. *Neurology*. 2012 Jul 17;79(3):267–73.
128. James E, Dobson R, Kuhle J, Baker D, Giovannoni G, Ramagopalan SV. The effect of vitamin D-related interventions on multiple sclerosis relapses: a meta-analysis. *Mult Scler*. 2013 May 22;1352458513489756.
129. Stewart N, Simpson S Jr, van der Mei I, Ponsonby A-L, Blizzard L, Dwyer T, et al. Interferon- β and serum 25-hydroxyvitamin D interact to modulate relapse risk in MS. *Neurology*. 2012 Jul 17;79(3):254–60.
130. Lucas RM, Ponsonby A-L, Dear K, Valery PC, Pender MP, Taylor BV, et al. Sun exposure and vitamin D are independent risk factors for CNS demyelination. *Neurology*. 2011 Feb 8;76(6):540–8.
131. Bäärnhielm M, Hedström AK, Kockum I, Sundqvist E, Gustafsson SA, Hillert J, et al. Sunlight is associated with decreased multiple sclerosis risk: no interaction with human leukocyte antigen-DRB1*15. *Eur J Neurol*. 2012 Jul;19(7):955–62.
132. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain*. 1989 Feb;112 (Pt 1):133–46.
133. Vukusic S, Confavreux C. Natural history of multiple sclerosis: risk factors and prognostic indicators. *Curr Opin Neurol*. 2007 Jun;20(3):269–74.

134. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996 Apr;46(4):907–11.
135. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. 1993 Apr;43(4):655–61.
136. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol*. 1996 Mar;39(3):285–94.
137. Bornstein MB, Miller A, Slagle S, Weitzman M, Crystal H, Drexler E, et al. A pilot trial of Cop 1 in exacerbating-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1987 Aug 13;317(7):408–14.
138. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. 1995 Jul;45(7):1268–76.
139. Comi G, Filippi M, Wolinsky JS. European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging--measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. *Ann Neurol*. 2001 Mar;49(3):290–7.
140. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. *Lancet*. 1998 Nov 7;352(9139):1498–504.
141. Ford CC, Johnson KP, Lisak RP, Panitch HS, Shifronis G, Wolinsky JS. A prospective open-label study of glatiramer acetate: over a decade of continuous use in multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2006 Jun;12(3):309–20.

142. Brown MG, Kirby S, Skedgel C, Fisk JD, Murray TJ, Bhan V, et al. How effective are disease-modifying drugs in delaying progression in relapsing-onset MS? *Neurology*. 2007 Oct 9;69(15):1498–507.
143. Trojano M, Pellegrini F, Fuiani A, Paolicelli D, Zipoli V, Zimatore GB, et al. New natural history of interferon-beta-treated relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2007 Apr;61(4):300–6.
144. Johnson KP, Brooks BR, Ford CC, Goodman A, Guarnaccia J, Lisak RP, et al. Sustained clinical benefits of glatiramer acetate in relapsing multiple sclerosis patients observed for 6 years. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Mult Scler*. 2000 Aug;6(4):255–66.
145. Ford C, Goodman AD, Johnson K, Kachuck N, Lindsey JW, Lisak R, et al. Continuous long-term immunomodulatory therapy in relapsing multiple sclerosis: results from the 15-year analysis of the US prospective open-label study of glatiramer acetate. *Mult Scler*. 2010 Mar;16(3):342–50.
146. O'Connor P, Filippi M, Arnason B, Comi G, Cook S, Goodin D, et al. 250 microg or 500 microg interferon beta-1b versus 20 mg glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis: a prospective, randomised, multicentre study. *Lancet Neurol*. 2009 Oct;8(10):889–97.
147. Mikol DD, Barkhof F, Chang P, Coyle PK, Jeffery DR, Schwid SR, et al. Comparison of subcutaneous interferon beta-1a with glatiramer acetate in patients with relapsing multiple sclerosis (the REbif vs Glatiramer Acetate in Relapsing MS Disease [REGARD] study): a multicentre, randomised, parallel, open-label trial. *Lancet Neurol*. 2008 Oct;7(10):903–14.
148. Cadavid D, Wolansky LJ, Skurnick J, Lincoln J, Cheriyan J, Szczepanowski K, et al. Efficacy of treatment of MS with IFNbeta-1b or glatiramer acetate by monthly brain MRI in the BECOME study. *Neurology*. 2009 Jun 9;72(23):1976–83.
149. Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, Kinkel RP, Brownschidle CM, Murray TJ, et al. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med*. 2000 Sep 28;343(13):898–904.

150. Comi G, Filippi M, Barkhof F, Durelli L, Edan G, Fernández O, et al. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet*. 2001 May 19;357(9268):1576–82.
151. Kappos L, Polman CH, Freedman MS, Edan G, Hartung HP, Miller DH, et al. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2006 Oct 10;67(7):1242–9.
152. Comi G, Martinelli V, Rodegher M, Moiola L, Bajenaru O, Carra A, et al. Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2009 Oct 31;374(9700):1503–11.
153. Placebo-controlled multicentre randomised trial of interferon beta-1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis. European Study Group on interferon beta-1b in secondary progressive MS. *Lancet*. 1998 Nov 7;352(9139):1491–7.
154. Panitch H, Miller A, Paty D, Weinshenker B. Interferon beta-1b in secondary progressive MS: results from a 3-year controlled study. *Neurology*. 2004 Nov 23;63(10):1788–95.
155. Kappos L, Weinshenker B, Pozzilli C, Thompson AJ, Dahlke F, Beckmann K, et al. Interferon beta-1b in secondary progressive MS: a combined analysis of the two trials. *Neurology*. 2004 Nov 23;63(10):1779–87.
156. Randomized controlled trial of interferon- beta-1a in secondary progressive MS: Clinical results. *Neurology*. 2001 Jun 12;56(11):1496–504.
157. Cohen JA, Cutter GR, Fischer JS, Goodman AD, Heidenreich FR, Kooijmans MF, et al. Benefit of interferon beta-1a on MSFC progression in secondary progressive MS. *Neurology*. 2002 Sep 10;59(5):679–87.
158. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006 Mar 2;354(9):899–910.

159. Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA, Confavreux C, Galetta SL, Radue E-W, et al. Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006 Mar 2;354(9):911–23.
160. Kappos L, Radue E-W, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010 Feb 4;362(5):387–401.
161. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung H-P, Khatri BO, Montalban X, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010 Feb 4;362(5):402–15.
162. Hartung H-P, Gonsette R, König N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP, et al. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet*. 2002 Dec 21;360(9350):2018–25.
163. Kappos L, Bates D, Edan G, Eraksoy M, Garcia-Merino A, Grigoriadis N, et al. Natalizumab treatment for multiple sclerosis: updated recommendations for patient selection and monitoring. *Lancet Neurol*. 2011 Aug;10(8):745–58.
164. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, Subramanyam M, Goelz S, Natarajan A, et al. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med*. 2012 May 17;366(20):1870–80.
165. Villar L, Costa-Frossard L, Fernandez O, Montalban M, Casanova B, Izquierdo G, et al. Anti-lipid oligoclonal IgM bands contribute to PML risk stratification in MS patients treated with natalizumab. 29th Congress of the european committee for treatment and research in multiple sclerosis (ECTRIMS). Copenhagen, Denmark; 2-5 october 2013.;
166. Marriott JJ, Miyasaki JM, Gronseth G, O'Connor PW. Evidence Report: The efficacy and safety of mitoxantrone (Novantrone) in the treatment of multiple sclerosis: Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2010 May 4;74(18):1463–70.
167. Goodin DS, Arnason BG, Coyle PK, Frohman EM, Paty DW. The use of mitoxantrone (Novantrone) for the treatment of multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2003 Nov 25;61(10):1332–8.

168. O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, Comi G, Kappos L, Olsson TP, et al. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2011 Oct 6;365(14):1293–303.
169. Freedman MS, Wolinsky JS, Wamil B, Confavreux C, Comi G, Kappos L, et al. Teriflunomide added to interferon- β in relapsing multiple sclerosis: a randomized phase II trial. *Neurology*. 2012 Jun 5;78(23):1877–85.
170. Kappos L, Gold R, Miller DH, Macmanus DG, Havrdova E, Limmroth V, et al. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet*. 2008 Oct 25;372(9648):1463–72.
171. Trial watch: Phase III success for Biogen's oral multiple sclerosis therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Jun;10(6):404.
172. Coles AJ, Fox E, Vladic A, Gazda SK, Brinar V, Selmaj KW, et al. Alemtuzumab more effective than interferon β -1a at 5-year follow-up of CAMMS223 clinical trial. *Neurology*. 2012 Apr 3;78(14):1069–78.
173. Coles AJ, Compston DAS, Selmaj KW, Lake SL, Moran S, Margolin DH, et al. Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008 Oct 23;359(17):1786–801.
174. Comi G, Jeffery D, Kappos L, Montalban X, Boyko A, Rocca MA, et al. Placebo-controlled trial of oral laquinimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012 Mar 15;366(11):1000–9.
175. Wynn D, Kaufman M, Montalban X, Vollmer T, Simon J, Elkins J, et al. Daclizumab in active relapsing multiple sclerosis (CHOICE study): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, add-on trial with interferon beta. *Lancet Neurol*. 2010 Apr;9(4):381–90.
176. Kappos L, Li D, Calabresi PA, O'Connor P, Bar-Or A, Barkhof F, et al. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*. 2011 Nov 19;378(9805):1779–87.

177. Río J, Castelló J, Rovira A, Tintoré M, Sastre-Garriga J, Horga A, et al. Measures in the first year of therapy predict the response to interferon beta in MS. *Mult Scler*. 2009 Jul;15(7):848–53.
178. Río J, Nos C, Tintoré M, Borrás C, Galán I, Comabella M, et al. Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. *Ann Neurol*. 2002 Oct;52(4):400–6.
179. Río J, Nos C, Tintoré M, Téllez N, Galán I, Pelayo R, et al. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 2006 Feb;59(2):344–52.
180. Ahn J, Feng X, Patel N, Dhawan N, Reder AT. Abnormal levels of interferon-gamma receptors in active multiple sclerosis are normalized by IFN-beta therapy: implications for control of apoptosis. *Front Biosci*. 2004 May 1;9:1547–55.
181. Cucci A, Barbero P, Clerico M, Ferrero B, Versino E, Contessa G, et al. Pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA blood level in multiple sclerosis is related to treatment response and interferon-beta dose. *J Neuroimmunol*. 2010 Sep 14;226(1-2):150–7.
182. Wandinger K-P, Lünemann JD, Wengert O, Bellmann-Strobl J, Aktas O, Weber A, et al. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet*. 2003 Jun 14;361(9374):2036–43.
183. Kurne A, Guc D, Canpinar H, Aydin OF, Sayat G, Yörübulut M, et al. Analysis of BAFF and TRAIL expression levels in multiple sclerosis patients: evaluation of expression under immunomodulatory therapy. *Acta Neurol Scand*. 2011 Jan;123(1):8–12.
184. López-Gómez C, Pino-Ángeles A, Órpez-Zafra T, Pinto-Medel MJ, Oliver-Martos B, Ortega-Pinazo J, et al. Candidate gene study of TRAIL and TRAIL receptors: association with response to interferon beta therapy in multiple sclerosis patients. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e62540.
185. Schreiner B, Mitsdoerffer M, Kieseier BC, Chen L, Hartung H-P, Weller M, et al. Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-

- L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2004 Oct;155(1-2):172–82.
186. Mitsdoerffer M, Schreiner B, Kieseier BC, Neuhaus O, Dichgans J, Hartung H-P, et al. Monocyte-derived HLA-G acts as a strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon-beta in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2005 Feb;159(1-2):155–64.
 187. Fainardi E, Rizzo R, Melchiorri L, Castellazzi M, Govoni V, Caniatti L, et al. Beneficial effect of interferon-beta 1b treatment in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with an increase in serum levels of soluble HLA-I molecules during the first 3 months of therapy. *J Neuroimmunol.* 2004 Mar;148(1-2):206–11.
 188. Minagar A, Adamashvili I, Kelley RE, Gonzalez-Toledo E, McLarty J, Smith SJ. Saliva soluble HLA as a potential marker of response to interferon-beta 1a in multiple sclerosis: a preliminary study. *J Neuroinflammation.* 2007;4:16.
 189. Graber J, Zhan M, Ford D, Kursch F, Francis G, Bever C, et al. Interferon-beta-1a induces increases in vascular cell adhesion molecule: implications for its mode of action in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2005 Apr;161(1-2):169–76.
 190. Soilu-Hänninen M, Laaksonen M, Hänninen A, Erälinna J-P, Panelius M. Downregulation of VLA-4 on T cells as a marker of long term treatment response to interferon beta-1a in MS. *J Neuroimmunol.* 2005 Oct;167(1-2):175–82.
 191. Wiesemann E, Deb M, Trebst C, Hemmer B, Stangel M, Windhagen A. Effects of interferon-beta on co-signaling molecules: upregulation of CD40, CD86 and PD-L2 on monocytes in relation to clinical response to interferon-beta treatment in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008 Mar;14(2):166–76.
 192. Marckmann S, Wiesemann E, Hilse R, Trebst C, Stangel M, Windhagen A. Interferon-beta up-regulates the expression of co-stimulatory molecules CD80, CD86 and CD40 on monocytes: significance for treatment of multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 2004 Dec;138(3):499–506.

193. Chadha K, Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Bhasi K, Muhitch J, Feichter J, et al. Interferon inhibitory activity in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2006 Nov;63(11):1579–84.
194. Wieseemann E, Deb M, Hemmer B, Radeke HH, Windhagen A. Early identification of interferon-beta responders by ex vivo testing in patients with multiple sclerosis. *Clin Immunol*. 2008 Sep;128(3):306–13.
195. Ozenci V, Kouwenhoven M, Huang YM, Kivisäkk P, Link H. Multiple sclerosis is associated with an imbalance between tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha)- and IL-10-secreting blood cells that is corrected by interferon-beta (IFN-beta) treatment. *Clin Exp Immunol*. 2000 Apr;120(1):147–53.
196. Carrieri PB, Ladogana P, Di Spigna G, de Leva MF, Petracca M, Montella S, et al. Interleukin-10 and interleukin-12 modulation in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis on therapy with interferon-beta 1a: differences in responders and non responders. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2008;30(4):1–9.
197. Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, van der Voort LF, Bhat R, De Sarno P, et al. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med*. 2010 Apr;16(4):406–12.
198. Dhib-Jalbut S, Sumandeep S, Valenzuela R, Ito K, Patel P, Rametta M. Immune response during interferon beta-1b treatment in patients with multiple sclerosis who experienced relapses and those who were relapse-free in the START study. *J Neuroimmunol*. 2013 Jan 15;254(1-2):131–40.
199. Kappos L, Clanet M, Sandberg-Wollheim M, Radue EW, Hartung HP, Hohlfeld R, et al. Neutralizing antibodies and efficacy of interferon beta-1a: a 4-year controlled study. *Neurology*. 2005 Jul 12;65(1):40–7.
200. Pachner AR, Warth JD, Pace A, Goelz S, INSIGHT investigators. Effect of neutralizing antibodies on biomarker responses to interferon beta: the INSIGHT study. *Neurology*. 2009 Nov 3;73(18):1493–500.
201. Bosca I, Villar LM, Coret F, Magraner MJ, Simó-Castelló M, Alvarez-Cermeño JC, et al. Response to interferon in multiple sclerosis is related to lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Mult Scler*. 2010 Jul;16(7):810–5.

202. Sriram U, Barcellos LF, Villoslada P, Rio J, Baranzini SE, Caillier S, et al. Pharmacogenomic analysis of interferon receptor polymorphisms in multiple sclerosis. *Genes Immun*. 2003 Mar;4(2):147–52.
203. Leyva L, Fernández O, Fedetz M, Blanco E, Fernández VE, Oliver B, et al. IFNAR1 and IFNAR2 polymorphisms confer susceptibility to multiple sclerosis but not to interferon-beta treatment response. *J Neuroimmunol*. 2005 Jun;163(1-2):165–71.
204. Wergeland S, Beiske A, Nyland H, Hovdal H, Jensen D, Larsen JP, et al. IL-10 promoter haplotype influence on interferon treatment response in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2005 Mar;12(3):171–5.
205. Cunningham S, Graham C, Hutchinson M, Droogan A, O'Rourke K, Patterson C, et al. Pharmacogenomics of responsiveness to interferon IFN-beta treatment in multiple sclerosis: a genetic screen of 100 type I interferon-inducible genes. *Clin Pharmacol Ther*. 2005 Dec;78(6):635–46.
206. O'Doherty C, Favorov A, Heggarty S, Graham C, Favorova O, Ochs M, et al. Genetic polymorphisms, their allele combinations and IFN-beta treatment response in Irish multiple sclerosis patients. *Pharmacogenomics*. 2009 Jul;10(7):1177–86.
207. Martínez A, de las Heras V, Mas Fontao A, Bartolomé M, de la Concha EG, Urcelay E, et al. An IFNG polymorphism is associated with interferon-beta response in Spanish MS patients. *J Neuroimmunol*. 2006 Apr;173(1-2):196–9.
208. Byun E, Caillier SJ, Montalban X, Villoslada P, Fernández O, Brassat D, et al. Genome-wide pharmacogenomic analysis of the response to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2008 Mar;65(3):337–44.
209. Comabella M, Craig DW, Morcillo-Suárez C, Río J, Navarro A, Fernández M, et al. Genome-wide scan of 500,000 single-nucleotide polymorphisms among responders and nonresponders to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2009 Aug;66(8):972–8.
210. Vandenbroeck K, Comabella M. Single-nucleotide polymorphisms in response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res*. 2010 Oct;30(10):727–32.

211. Vandenbroeck K, Urcelay E, Comabella M. IFN-beta pharmacogenomics in multiple sclerosis. *Pharmacogenomics*. 2010 Aug;11(8):1137–48.
212. Weinstock-Guttman B, Tamaño-Blanco M, Bhasi K, Zivadinov R, Ramanathan M. Pharmacogenetics of MXA SNPs in interferon-beta treated multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2007 Jan;182(1-2):236–9.
213. Cénit MDC, Blanco-Kelly F, de las Heras V, Bartolomé M, de la Concha EG, Urcelay E, et al. Glypican 5 is an interferon-beta response gene: a replication study. *Mult Scler*. 2009 Aug;15(8):913–7.
214. Vandenbroeck K, Alloza I, Swaminathan B, Antigüedad A, Otaegui D, Olascoaga J, et al. Validation of IRF5 as multiple sclerosis risk gene: putative role in interferon beta therapy and human herpes virus-6 infection. *Genes Immun*. 2011 Jan;12(1):40–5.
215. Villoslada P, Barcellos LF, Rio J, Begovich AB, Tintore M, Sastre-Garriga J, et al. The HLA locus and multiple sclerosis in Spain. Role in disease susceptibility, clinical course and response to interferon-beta. *J Neuroimmunol*. 2002 Sep;130(1-2):194–201.
216. Fernández O, Fernández V, Mayorga C, Guerrero M, León A, Tamayo JA, et al. HLA class II and response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2005 Dec;112(6):391–4.
217. Comabella M, Fernández-Arquero M, Río J, Guinea A, Fernández M, Cénit MC, et al. HLA class I and II alleles and response to treatment with interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2009 May 29;210(1-2):116–9.
218. Teitelbaum D, Meshorer A, Hirshfeld T, Arnon R, Sela M. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol*. 1971 Aug;1(4):242–8.
219. Arnon R, Sela M, Teitelbaum D. New insights into the mechanism of action of copolymer 1 in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neurol*. 1996 Apr;243(4 Suppl 1):S8–13.

220. Lalive PH, Neuhaus O, Benkhoucha M, Burger D, Hohlfeld R, Zamvil SS, et al. Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis: emerging concepts regarding its mechanism of action. *CNS Drugs*. 2011 May;25(5):401–14.
221. Racke MK, Lovett-Racke AE. Glatiramer acetate treatment of multiple sclerosis: an immunological perspective. *J Immunol*. 2011 Feb 15;186(4):1887–90.
222. Racke MK, Lovett-Racke AE, Karandikar NJ. The mechanism of action of glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010 Jan 5;74 Suppl 1:S25–30.
223. Neuhaus O, Farina C, Wekerle H, Hohlfeld R. Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology*. 2001 Mar 27;56(6):702–8.
224. Fridkis-Hareli M, Teitelbaum D, Gurevich E, Pecht I, Brautbar C, Kwon OJ, et al. Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells--specificity and promiscuity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 May 24;91(11):4872–6.
225. Webb C, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M. In vivo and in vitro immunological cross-reactions between basic encephalitogen and synthetic basic polypeptides capable of suppressing experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol*. 1973 May;3(5):279–86.
226. Aharoni R, Teitelbaum D, Sela M, Arnon R. Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Sep 30;94(20):10821–6.
227. Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M. Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Jan 19;96(2):634–9.
228. Arnon R, Aharoni R. Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Oct 5;101 Suppl 2:14593–8.

229. Gran B, Tranquill LR, Chen M, Bielekova B, Zhou W, Dhib-Jalbut S, et al. Mechanisms of immunomodulation by glatiramer acetate. *Neurology*. 2000 Dec 12;55(11):1704–14.
230. Hong J, Li N, Zhang X, Zheng B, Zhang JZ. Induction of CD4+CD25+ regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 May 3;102(18):6449–54.
231. Duda PW, Schmied MC, Cook SL, Krieger JI, Hafler DA. Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2000 Apr;105(7):967–76.
232. Karandikar NJ, Crawford MP, Yan X, Ratts RB, Brenchley JM, Ambrozak DR, et al. Glatiramer acetate (Copaxone) therapy induces CD8(+) T cell responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2002 Mar;109(5):641–9.
233. Tennakoon DK, Mehta RS, Ortega SB, Bhoj V, Racke MK, Karandikar NJ. Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2006 Jun 1;176(11):7119–29.
234. Kim HJ, Ifergan I, Antel JP, Seguin R, Duddy M, Lapierre Y, et al. Type 2 monocyte and microglia differentiation mediated by glatiramer acetate therapy in patients with multiple sclerosis. *J Immunol*. 2004 Jun 1;172(11):7144–53.
235. Weber MS, Starck M, Wagenpfeil S, Meinl E, Hohlfeld R, Farina C. Multiple sclerosis: glatiramer acetate inhibits monocyte reactivity in vitro and in vivo. *Brain*. 2004 Jun;127(Pt 6):1370–8.
236. Weber MS, Prod'homme T, Youssef S, Dunn SE, Rundle CD, Lee L, et al. Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nat Med*. 2007 Aug;13(8):935–43.
237. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*. 2002 Oct;3(10):944–50.
238. Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4(+) T cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2010 Apr;10(4):236–47.

239. Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA Jr. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med*. 1996 Dec 1;184(6):2271–8.
240. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz J-D, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest*. 2008 Oct;118(10):3420–30.
241. Kala M, Rhodes SN, Piao W-H, Shi F-D, Campagnolo DI, Vollmer TL. B cells from glatiramer acetate-treated mice suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Neurol*. 2010 Jan;221(1):136–45.
242. Begum-Haque S, Sharma A, Christy M, Lentini T, Ochoa-Reparaz J, Fayed IF, et al. Increased expression of B cell-associated regulatory cytokines by glatiramer acetate in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2010 Feb 26;219(1-2):47–53.
243. Ziemssen T, Kümpfel T, Klinkert WEF, Neuhaus O, Hohlfeld R. Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. Brain-derived neurotrophic factor. *Brain*. 2002 Nov;125(Pt 11):2381–91.
244. Ziemssen T, Kümpfel T, Schneider H, Klinkert WEF, Neuhaus O, Hohlfeld R. Secretion of brain-derived neurotrophic factor by glatiramer acetate-reactive T-helper cell lines: Implications for multiple sclerosis therapy. *J Neurol Sci*. 2005 Jun 15;233(1-2):109–12.
245. Schrempf W, Ziemssen T. Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2007 Aug;6(7):469–75.
246. Farina C, Then Bergh F, Albrecht H, Meinl E, Yassouridis A, Neuhaus O, et al. Treatment of multiple sclerosis with Copaxone (COP): Elispot assay detects COP-induced interleukin-4 and interferon-gamma response in blood cells. *Brain*. 2001 Apr;124(Pt 4):705–19.
247. Farina C, Wagenpfeil S, Hohlfeld R. Immunological assay for assessing the efficacy of glatiramer acetate (Copaxone) in multiple sclerosis. A pilot study. *J Neurol*. 2002 Nov;249(11):1587–92.

248. Valenzuela RM, Costello K, Chen M, Said A, Johnson KP, Dhib-Jalbut S. Clinical response to glatiramer acetate correlates with modulation of IFN-gamma and IL-4 expression in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2007 Jul;13(6):754–62.
249. Wieseemann E, Klatt J, Wenzel C, Heidenreich F, Windhagen A. Correlation of serum IL-13 and IL-5 levels with clinical response to Glatiramer acetate in patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2003 Sep;133(3):454–60.
250. Sellebjerg F, Hedegaard CJ, Krakauer M, Hesse D, Lund H, Nielsen CH, et al. Glatiramer acetate antibodies, gene expression and disease activity in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2012 Mar;18(3):305–13.
251. Fusco C, Andreone V, Coppola G, Luongo V, Guerini F, Pace E, et al. HLA-DRB1*1501 and response to copolymer-1 therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology*. 2001 Dec 11;57(11):1976–9.
252. Gross R, Healy BC, Cepok S, Chitnis T, Khoury SJ, Hemmer B, et al. Population structure and HLA DRB1 1501 in the response of subjects with multiple sclerosis to first-line treatments. *J Neuroimmunol*. 2011 Apr;233(1-2):168–74.
253. Tsareva EY, Kulakova OG, Boyko AN, Shchur SG, Lvovs D, Favorov AV, et al. Allelic combinations of immune-response genes associated with glatiramer acetate treatment response in Russian multiple sclerosis patients. *Pharmacogenomics*. 2012 Jan;13(1):43–53.
254. Grossman I, Avidan N, Singer C, Goldstaub D, Hayardeny L, Eyal E, et al. Pharmacogenetics of glatiramer acetate therapy for multiple sclerosis reveals drug-response markers. *Pharmacogenet Genomics*. 2007 Aug;17(8):657–66.
255. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011 Feb;69(2):292–302.
256. Zivković M, Stanković A, Dincić E, Popović M, Popović S, Raicević R, et al. The tag SNP for HLA-DRB1*1501, rs3135388, is significantly associated with multiple sclerosis susceptibility: cost-effective high-throughput detection by real-time PCR. *Clin Chim Acta*. 2009 Aug;406(1-2):27–30.

257. Goris A, Walton A, Ban M, Dubois B, Compston A, Sawcer S. A Taqman assay for high-throughput genotyping of the multiple sclerosis-associated HLA-DRB1*1501 allele. *Tissue Antigens*. 2008 Oct;72(4):401–3.
258. Centro Nacional de Genotipado [Internet]. Tecnologías de genotipado. Tecnología iPLEX(R) Gold MassARRAY Sequenom. Available from: www.cegen.org
259. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000 May;25(1):25–9.
260. Bloch DB, de la Monte SM, Guigaouri P, Filippov A, Bloch KD. Identification and characterization of a leukocyte-specific component of the nuclear body. *J Biol Chem*. 1996 Nov 15;271(46):29198–204.
261. Ryan EJ, Marshall AJ, Magaletti D, Floyd H, Draves KE, Olson NE, et al. Dendritic cell-associated lectin-1: a novel dendritic cell-associated, C-type lectin-like molecule enhances T cell secretion of IL-4. *J Immunol*. 2002 Nov 15;169(10):5638–48.
262. Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, et al. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science*. 2003 Nov 7;302(5647):1041–3.
263. Intlekofer AM, Banerjee A, Takemoto N, Gordon SM, Dejong CS, Shin H, et al. Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science*. 2008 Jul 18;321(5887):408–11.
264. Lefebvre C, Rajbhandari P, Alvarez MJ, Bandaru P, Lim WK, Sato M, et al. A human B-cell interactome identifies MYB and FOXM1 as master regulators of proliferation in germinal centers. *Mol Syst Biol*. 2010 Jun 8;6:377.
265. Nakata Y, Brignier AC, Jin S, Shen Y, Rudnick SI, Sugita M, et al. c-Myb, Menin, GATA-3, and MLL form a dynamic transcription complex that plays a pivotal role in human T helper type 2 cell development. *Blood*. 2010 Aug 26;116(8):1280–90.
266. Eldridge AG, Loktev AV, Hansen DV, Verschuren EW, Reimann JDR, Jackson PK. The *evi5* oncogene regulates cyclin accumulation by stabilizing the anaphase-promoting complex inhibitor *emi1*. *Cell*. 2006 Jan 27;124(2):367–80.

267. Muto A, Tashiro S, Nakajima O, Hoshino H, Takahashi S, Sakoda E, et al. The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature*. 2004 Jun 3;429(6991):566–71.
268. Watanabe-Matsui M, Muto A, Matsui T, Itoh-Nakadai A, Nakajima O, Murayama K, et al. Heme regulates B-cell differentiation, antibody class switch, and heme oxygenase-1 expression in B cells as a ligand of Bach2. *Blood*. 2011 May 19;117(20):5438–48.
269. Roychoudhuri R, Hirahara K, Mousavi K, Clever D, Klebanoff CA, Bonelli M, et al. BACH2 represses effector programs to stabilize T(reg)-mediated immune homeostasis. *Nature*. 2013 Jun 27;498(7455):506–10.
270. Reinthaler E, Machetanz G, Hotzy C, Reindl M, Fazekas F, Kristoferitsch W, et al. No evidence for a role of rare CYP27B1 variants in Austrian multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2013 Jul 25;
271. Sharma M, Li X, Wang Y, Zarnegar M, Huang C-Y, Palvimo JJ, et al. hZimp10 is an androgen receptor co-activator and forms a complex with SUMO-1 at replication foci. *EMBO J*. 2003 Nov 17;22(22):6101–14.
272. Weisz A, Marx P, Sharf R, Appella E, Driggers PH, Ozato K, et al. Human interferon consensus sequence binding protein is a negative regulator of enhancer elements common to interferon-inducible genes. *J Biol Chem*. 1992 Dec 15;267(35):25589–96.
273. Tamura T, Ozato K. ICSBP/IRF-8: its regulatory roles in the development of myeloid cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2002 Jan;22(1):145–52.
274. Wyss DF, Choi JS, Li J, Knoppers MH, Willis KJ, Arulanandam AR, et al. Conformation and function of the N-linked glycan in the adhesion domain of human CD2. *Science*. 1995 Sep 1;269(5228):1273–8.
275. Papadopoulou LC, Sue CM, Davidson MM, Tanji K, Nishino I, Sadlock JE, et al. Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat Genet*. 1999 Nov;23(3):333–7.

276. Goodwin RG, Lupton S, Schmierer A, Hjerrild KJ, Jerzy R, Clevenger W, et al. Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989 Jan;86(1):302–6.
277. Xu W, Presnell SR, Parrish-Novak J, Kindsvogel W, Jaspers S, Chen Z, et al. A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Aug 14;98(17):9511–6.
278. Dumoutier L, Lejeune D, Colau D, Renauld JC. Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J Immunol*. 2001 Jun 15;166(12):7090–5.
279. Shimojima M, Takada A, Ebihara H, Neumann G, Fujioka K, Irimura T, et al. Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J Virol*. 2006 Oct;80(20):10109–16.
280. Mao M, Biery MC, Kobayashi SV, Ward T, Schimmack G, Burchard J, et al. T lymphocyte activation gene identification by coregulated expression on DNA microarrays. *Genomics*. 2004 Jun;83(6):989–99.
281. Graham M, Adams JM. Chromosome 8 breakpoint far 3' of the c-myc oncogene in a Burkitt's lymphoma 2;8 variant translocation is equivalent to the murine pvt-1 locus. *EMBO J*. 1986 Nov;5(11):2845–51.
282. Carramusa L, Contino F, Ferro A, Minafra L, Perconti G, Giallongo A, et al. The PVT-1 oncogene is a Myc protein target that is overexpressed in transformed cells. *J Cell Physiol*. 2007 Nov;213(2):511–8.
283. Luzi P, Rafi MA, Wenger DA. Structure and organization of the human galactocerebrosidase (GALC) gene. *Genomics*. 1995 Mar 20;26(2):407–9.
284. Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, Dwyer CM, McComas W, Motyka R, et al. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 May 15;88(10):4143–7.
285. Chen KS, Prah JM, DeLuca HF. Isolation and expression of human 1,25-dihydroxyvitamin D3 24-hydroxylase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 May 15;90(10):4543–7.

286. Fischer AM, Katayama CD, Pagès G, Pouyssegur J, Hedrick SM. The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity*. 2005 Oct;23(4):431–43.
287. Peach RJ, Bajorath J, Naemura J, Leytze G, Greene J, Aruffo A, et al. Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T cell surface receptors CTLA-4 and CD28. *J Biol Chem*. 1995 Sep 8;270(36):21181–7.
288. Betz BC, Jordan-Williams KL, Wang C, Kang SG, Liao J, Logan MR, et al. Batf coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses. *J Exp Med*. 2010 May 10;207(5):933–42.
289. Schraml BU, Hildner K, Ise W, Lee W-L, Smith WA-E, Solomon B, et al. The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature*. 2009 Jul 16;460(7253):405–9.
290. Tussiwand R, Lee W-L, Murphy TL, Mashayekhi M, Wumesh KC, Albring JC, et al. Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature*. 2012 Oct 25;490(7421):502–7.
291. Kuroda S, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Takayanagi H, Iwai Y. Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like (BATF) regulates epigenetically and energetically effector CD8 T-cell differentiation via Sirt1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Sep 6;108(36):14885–9.
292. Ise W, Kohyama M, Schraml BU, Zhang T, Schwer B, Basu U, et al. The transcription factor BATF controls the global regulators of class-switch recombination in both B cells and T cells. *Nat Immunol*. 2011 Jun;12(6):536–43.
293. Virtaneva KI, Angelisová P, Baumruker T, Horejsí V, Nevanlinna H, Schröder J. The genes for CD37, CD53, and R2, all members of a novel gene family, are located on different chromosomes. *Immunogenetics*. 1993;37(6):461–5.
294. Felsher DW, Zetterberg A, Zhu J, Tlsty T, Bishop JM. Overexpression of MYC causes p53-dependent G2 arrest of normal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 Sep 12;97(19):10544–8.

295. Regan JW. EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life Sci.* 2003 Dec 5;74(2-3):143–53.
296. Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem.* 2007 Apr 20;282(16):11613–7.
297. Ouimet T, Facchinetti P, Rose C, Bonhomme MC, Gros C, Schwartz JC, et al. Neprilysin II: A putative novel metalloprotease and its isoforms in CNS and testis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 May 19;271(3):565–70.
298. Hodson DJ, Janas ML, Galloway A, Bell SE, Andrews S, Li CM, et al. Deletion of the RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 leads to perturbed thymic development and T lymphoblastic leukemia. *Nat Immunol.* 2010 Aug;11(8):717–24.
299. Nasir A, Norton JD, Baou M, Zekavati A, Bijlmakers M-J, Thompson S, et al. ZFP36L1 negatively regulates plasmacytoid differentiation of BCL1 cells by targeting BLIMP1 mRNA. *PLoS ONE.* 2012;7(12):e52187.
300. Hoppenbrouwers IA, Aulchenko YS, Janssens AC, Ramagopalan SV, Broer L, Kayser M, et al. Replication of CD58 and CLEC16A as genome-wide significant risk genes for multiple sclerosis. *J Hum Genet.* 2009 Nov;54(11):676–80.
301. Ruland J, Duncan GS, Wakeham A, Mak TW. Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity.* 2003 Nov;19(5):749–58.
302. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). Comprehensive follow-up of the first genome-wide association study of multiple sclerosis identifies KIF21B and TMEM39A as susceptibility loci. *Hum Mol Genet.* 2010 Mar 1;19(5):953–62.
303. Tyers M, Haslam RJ, Rachubinski RA, Harley CB. Molecular analysis of pleckstrin: the major protein kinase C substrate of platelets. *J Cell Biochem.* 1989 Jun;40(2):133–45.
304. Roll RL, Bauman EM, Bennett JS, Abrams CS. Phosphorylated pleckstrin induces cell spreading via an integrin-dependent pathway. *J Cell Biol.* 2000 Sep 18;150(6):1461–6.

305. Ma AD, Abrams CS. Pleckstrin induces cytoskeletal reorganization via a Rac-dependent pathway. *J Biol Chem*. 1999 Oct 1;274(40):28730–5.
306. Abrams CS, Zhao W, Belmonte E, Brass LF. Protein kinase C regulates pleckstrin by phosphorylation of sites adjacent to the N-terminal pleckstrin homology domain. *J Biol Chem*. 1995 Oct 6;270(40):23317–21.
307. Bogue CW, Zhang P-X, McGrath J, Jacobs HC, Fuleihan RL. Impaired B cell development and function in mice with a targeted disruption of the homeobox gene *Hex*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 Jan 21;100(2):556–61.
308. Lesourne R, Uehara S, Lee J, Song K-D, Li L, Pinkhasov J, et al. Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat Immunol*. 2009 Aug;10(8):840–7.
309. Firmbach-Kraft I, Byers M, Shows T, Dalla-Favera R, Krolewski JJ. *tyk2*, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes. *Oncogene*. 1990 Sep;5(9):1329–36.
310. Chen C, Gault A, Shen L, Nabavi N. Molecular cloning and expression of early T cell costimulatory molecule-1 and its characterization as B7-2 molecule. *J Immunol*. 1994 May 15;152(10):4929–36.
311. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VA Jr, Lombard LA, et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science*. 1993 Nov 5;262(5135):909–11.
312. Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD80 and CD86 are not equivalent in their ability to induce the tyrosine phosphorylation of CD28. *J Biol Chem*. 1999 Jan 29;274(5):3116–24.
313. Sasahara K, Yamaoka T, Moritani M, Tanaka M, Iwahana H, Yoshimoto K, et al. Molecular cloning and expression analysis of a putative nuclear protein, SR-25. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Mar 16;269(2):444–50.
314. Klitz W, Maiers M, Spellman S, Baxter-Lowe LA, Schmeckpeper B, Williams TM, et al. New HLA haplotype frequency reference standards: high-resolution and large sample typing of HLA DR-DQ haplotypes in a sample of European Americans. *Tissue Antigens*. 2003 Oct;62(4):296–307.

315. Wolinsky JS, Narayana PA, O'Connor P, Coyle PK, Ford C, Johnson K, et al. Glatiramer acetate in primary progressive multiple sclerosis: results of a multinational, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Neurol*. 2007 Jan;61(1):14–24.
316. Zwi bel HL, Copolymer-1 Treatment Study Principal Investigators. Glatiramer acetate in treatment-naïve and prior interferon-beta-1b-treated multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand*. 2006 Jun;113(6):378–86.
317. Meca-Lallana JE, de Mingo-Casado P, Amorin-Díaz M, Martínez-Navarro ML, Barreiro AF. Effects of glatiramer acetate on spasticity in previously interferon-beta-treated and treatment-naive patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a prospective, nonrandomized, open-label, uncontrolled, observational pilot study. *Clin Ther*. 2010 Jun;32(6):1061–6.
318. Meca-Lallana JE, Balseiro JJ, Lacruz F, Guijarro C, Sanchez O, Cano A, et al. Spasticity improvement in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis switching from interferon- β to glatiramer acetate: the Escala Study. *J Neurol Sci*. 2012 Apr 15;315(1-2):123–8.
319. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, et al. Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. 1998 Mar;50(3):701–8.
320. Wolinsky JS, Narayana PA, Johnson KP, Multiple Sclerosis Study Group and the MRI Analysis Center. United States open-label glatiramer acetate extension trial for relapsing multiple sclerosis: MRI and clinical correlates. Multiple Sclerosis Study Group and the MRI Analysis Center. *Mult Scler*. 2001 Feb;7(1):33–41.
321. Miller A, Spada V, Beerkircher D, Kreitman RR. Long-term (up to 22 years), open-label, compassionate-use study of glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008 May;14(4):494–9.
322. Rovaris M, Comi G, Rocca MA, Valsasina P, Ladkani D, Pieri E, et al. Long-term follow-up of patients treated with glatiramer acetate: a multicentre, multinational extension of the European/Canadian double-blind, placebo-controlled, MRI-monitored trial. *Mult Scler*. 2007 May;13(4):502–8.

323. Johnson KP, Brooks BR, Ford CC, Goodman A, Guarnaccia J, Lisak RP, et al. Sustained clinical benefits of glatiramer acetate in relapsing multiple sclerosis patients observed for 6 years. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Mult Scler*. 2000 Aug;6(4):255–66.
324. Sindic CJM, Seeldrayers P, Vande Gaer L, De Smet E, Nagels G, De Deyn PP, et al. Long-term follow up of glatiramer acetate compassionate use in Belgium. *Acta Neurol Belg*. 2005 Jun;105(2):81–5.
325. Fernández-Fernández Ó, Garcia-Trujillo L, Guerrero-Fernández M, León A, López-Madrona JC, Alonso A, et al. The effectiveness of glatiramer acetate in clinical practice: an observational study. *Rev Neurol*. 2012 Jan 1;54(1):1–9.
326. Pereira VCSR, Malfetano FR, Meira ID, Souza LF de, Liem AM, Maiolino A, et al. Clinical response to interferon beta and glatiramer acetate in multiple sclerosis patients: a Brazilian cohort. *Arq Neuropsiquiatr*. 2012 Oct;70(10):774–9.
327. Martinelli Boneschi F, Rovaris M, Johnson KP, Miller A, Wolinsky JS, Ladkani D, et al. Effects of glatiramer acetate on relapse rate and accumulated disability in multiple sclerosis: meta-analysis of three double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trials. *Mult Scler*. 2003 Aug;9(4):349–55.
328. Romeo M, Martinelli-Boneschi F, Rodegher M, Esposito F, Martinelli V, Comi G, et al. Clinical and MRI predictors of response to interferon-beta and glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol*. 2013 Jul;20(7):1060–7.
329. Hong J. Tejada-Simon MW, Rivera VM, Zang YCQ, Zang JZ. Anti-viral properties of interferon beta treatment in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2002 May; 8(3):237–42.

ANEXO I. SNPs-GWAS asociados con la respuesta al acetato de glatirámero

Rs11810217 (EVI5)	R		NR		OR	IC	P
	N	%	N	R			
Genotipos							
TT	9	8	8	13	0,568	0,208 – 1,552	0,265
CT	62	52	21	33	2,214	1,172 – 4,184	0,013
CC	47	40	34	54	0,565	0,305 – 1,047	0,068
Frecuencias alélicas							
T	80	34	37	29	1,23	0,75 – 2,03	0,38
C	156	66	89	71			

rs12212193 (BACH2)	R		NR		OR	IC	P
	N	%	N	R			
Genotipos							
GG	29	25	193	82	0,746	0,376 - 1,478	0,4
AG	56	48	29	12	1,045	0,564 - 1,936	0,890
AA	32	27	14	6	1,291	0,628 - 2,654	0,487
Frecuencias alélicas							
G	114	49	415	88	0,13	0,09 – 0,19	<0,0001
A	120	51	57	12			

rs12466022 (Gen no conocido)	R		NR		OR	IC	P
	N	%	N	R			
Genotipos							
AA	3	3	1	2	1,617	0,165 - 15,88	0,677
AC	47	40	16	25	1,945	0,989 - 3,825	0,052
CC	68	57	46	73	0,503	0,258 - 0,978	0,041
Frecuencias alélicas							
A	53	22	18	14	1,74	0,03 – 3,26	0,0621
C	183	78	108	86			

rs140522 (SCO2)	R		NR		OR	IC	P
	N	%	N	R			
Genotipos							
AA	8	7	13	21	0,280	0,109 – 0,718	0,006
AG	59	50	19	30	2,316	1,212 – 4,426	0,010
GG	51	43	31	49	0,786	0,425 – 1,451	0,441
Frecuencias alélicas							
A	75	32	45	36	0,84	0,52 – 1,36	0,449
G	161	68	81	64			

rs17066096 (IL22RA2)	R		NR		OR	IC	P
	N	%	N	R			
Genotipos							
GG	7	6	2	3	1,923	0,387 – 9,548	0,416
AG	37	31	30	48	0,502	0,268 – 0,943	0,031
AA	74	63	31	49	1,736	0,935 – 3,224	0,079
Frecuencias alélicas							
G	51	22	34	27	0,75	0,44 – 1,27	0,250
A	185	78	92	73			

rs2303759 (CD37)	R		NR		OR	IC	P
	N	%	N	R			
Genotipos							
GG	5	4	5	8	0,513	0,143 – 1,845	0,299
GT	48	41	16	25	2,014	1,025 – 3,959	0,041
TT	65	55	42	67	0,613	0,324 – 1,160	0,131
Frecuencias alélicas							
G	58	25	26	26	1,25	0,72 – 2,19	0,397
T	178	75	100	74			

rs7238078 (MALT1)	R		NR		OR	IC	P
	N	%	N	R			
Genotipos							
GG	5	4	4	6	0,653	0,169 – 2,522	0,534
GT	44	37	13	21	2,287	1,118 – 0,676	0,022
TT	69	58	46	73	0,520	0,267 – 1,013	0,053
Frecuencias alélicas							
G	54	23	21	17	1,48	0,82 – 2,70	0,165
T	182	77	105	83			

rs7522462 (KIF21B)	R		NR		OR	IC	P
	N	%	N	R			
Genotipos							
AA	1	1	5	8	0,097	0,011 - 0,846	0,010
AG	41	35	22	36	0,956	0,501 - 1,825	0,892
GG	75	64	34	56	1,418	0,755 - 2,665	0,277
Frecuencias alélicas							
A	43	18	32	26	0,63	0,36 – 1,10	0,085
G	191	82	90	74			

rs7595037 (PLEK)	R		NR		OR	IC	P
	N	%	N	R			
Genotipos							
CC	15	13	17	27	0,394	0,181 - 0,857	0,017
CT	59	50	22	35	1,864	0,991 – 3,504	0,052
TT	44	37	24	38	0,966	0,514 – 1,815	0,915
Frecuencias alélicas							
C	89	38	56	44	0,76	0,48 – 1,20	0,213
T	147	62	70	56			

ANEXO II. SNPs-GWAS con tendencia a la asociación con la respuesta al acetato de glatirámico

rs10466829 (CLECL1)	R		NR		OR	IC	P
	N	%	N	R			
Genotipos							
AA	41	35	18	28	1,331	0,685 - 2,589	0,399
AG	62	52	30	48	1,218	0,660 - 2,247	0,528
GG	15	13	15	24	0,466	0,211 - 1,030	0,056
Frecuencias alélicas							
A	144	61	66	52	1,42	0,90-2,25	0,113
G	92	39	60	48			

rs13333054 (IRF8)	R		NR		OR	IC	P
	N	%	N	R			
Genotipos							
TT	6	5	1	1	3,321	0,391 -28,22	0,245
CT	23	20	20	32	0,521	0,259 - 1,047	0,065
CC	89	75	42	67	1,534	0,785 - 3,001	0,209
Frecuencias alélicas							
T	35	15	22	17	0,82	0,44 – 1,54	0,513
C	201	85	104	83			

rs2019960 (PVT1)	R		NR		OR	IC	P
	N	%	N	R			
Genotipos							
CC	6	5	0	0	0,640	0,573 - 0,715	0,069
CT	41	35	26	41	0,758	0,404 - 1,421	0,387
TT	71	60	37	59	1,062	0,570 - 1,978	0,851
Frecuencias alélicas							
C	53	22	26	21	1,11	0,64 - 1,96	0,689
T	183	78	100	79			

rs2248359 (CYP24A1)	R		NR		OR	IC	P
	N	%	N	R			
Genotipos							
TT	14	12	14	22	0,471	0,209 - 1,064	0,066
CT	63	53	24	38	1,861	0,997 - 3,474	0,05
CC	41	35	25	40	0,809	0,431 - 1,521	0,511
Frecuencias alélicas							
T	91	39	52	41	0,89	0,56 - 1,42	0,615
C	145	61	74	59			

rs802734 (THEMIS)	R		NR		OR	IC	P
	N	%	N	R			
Genotipos							
CC	9	8	7	11	0,667	0,236 - 1,884	0,442
CT	49	42	18	29	1,801	0,932 - 3,480	0,078
TT	59	50	38	60	0,669	0,360 - 1,246	0,204
Frecuencias alélicas							
C	67	29	32	25	1,18	0,70 - 1,98	0,512
T	167	71	94	75			

**ANEXO III. SNPs-GWAS no asociados con la respuesta al acetato de
glatirámero**

rs10201872 Gen SP140	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
TT	3	2	2	3	0,803	0,131-4,934	0,812
CT	37	32	19	30	1,071	0,551-2,081	0,840
CC	77	65	42	67	0,963	0,503-1,841	0,908
Frecuencias alélicas							
T	43	18	23	18	1,01	0,56-1,83	0,977
C	191	82	103	82			

Rs11129295 (EOMES)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
TT	43	39	20	33	1,265	0,654 -2,444	0,484
CT	53	48	28	47	1,044	0,557-1,959	0,893
CC	15	13	12	20	0,625	0,271 -1,440	0,267
Frecuencias alélicas							
T	139	63	68	57	1,28	0,79 – 2,06	0,283
C	83	37	52	43			

rs11154801 (MYB)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
AA	21	18	10	16	1,147	0,503 - 2,616	0,744
AC	61	52	27	43	1,427	0,771 - 2,642	0,257
CC	36	30	26	41	0,625	0,331 - 1,181	0,146
Frecuencias alélicas							
A	103	44	47	37	1,30	0,82 - 2,08	0,243
C	133	56	79	63			

rs12368653 (CYP27B1)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
AA	53	45	27	43	1,057	0,569 - 1,964	0,861
AG	44	37	24	39	0,941	0,500 - 1,773	0,852
GG	21	18	11	18	1,004	0,449 - 2,244	0,993
Frecuencias alélicas							
A	150	64	78	63	1,03	0,64 - 1,65	0,902
G	86	36	46	27			

Rs1250550 (ZMIZ1)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
TT	13	11	6	9	1,176	0,424 – 3,261	0,755
GT	51	43	30	48	0,837	0,453 – 1,547	0,571
GG	54	46	27	43	1,125	0,607 – 2,084	0,708
Frecuencias alélicas							
T	77	33	42	33	0,97	0,60 – 1,57	0,892
G	159	67	84	67			

rs13192841 (Gen no conocido)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
AA	13	11	12	19	0,526	0,224 – 1,235	0,136
AG	49	42	22	35	1,323	0,702 – 2,596	0,386
GG	56	47	29	46	1,059	0,574 – 1,955	0,855
Frecuencias alélicas							
A	75	32	46	37	0,81	0,50 – 1,31	0,364
G	161	68	80	63			

rs1335532 (CD58)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
CC	1	1	0	0	0,650	0,584 – 0,724	0,464
CT	18	15	11	17	0,851	0,374 – 1,935	0,700
TT	99	84	52	83	1,102	0,488 – 2,490	0,815
Frecuencias alélicas							
C	20	9	11	9	0,97	0,42 – 2,24	0,934
T	216	91	115	91			

rs1520333 (IL7)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
CC	8	7	5	8	0,844	0,264 – 2,696	0,774
CT	49	41	26	41	1,011	0,543 – 1,880	0,973
TT	61	52	32	51	1,037	0,562 – 1,912	0,908
Frecuencias alélicas							
C	65	28	36	29	0,95	0,57 – 1,58	0,835
T	171	72	90	71			

rs17174870 (MERTK)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
TT	4	3	1	2	2,175	0,238 – 19,891	0,481
CT	35	30	21	33	0,843	0,438 – 1,625	0,611
CC	79	67	41	65	1,087	0,571 – 2,071	0,800
Frecuencias alélicas							
T	43	18	23	18	1	0,55 – 1,82	0,993
C	193	82	103	82			

rs1738074 (TAGAP)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
AA	15	13	9	15	0,892	0,366 – 2,175	0,802
AG	59	52	33	53	0,943	0,507 – 1,752	0,852
GG	40	35	20	32	1,135	0,589 – 2,189	0,705
Frecuencias alélicas							
A	89	39	51	41	0,74	0,46 – 1,20	0,199
G	139	61	73	59			

rs2119704 (GALC)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
AA	0	0	0	0			
AC	12	10	6	10	1,075	0,383 – 3,017	0,890
CC	106	90	57	90			
Frecuencias alélicas							
A	12	5	6	5	1,07	0,36 – 3,29	0,893
C	224	95	120	95			

rs2243123 (IL12A)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
CC	6	5	6	9	0,509	0,157 – 1,649	0,253
CT	44	37	22	35	1,108	0,585 – 2,098	0,753
TT	68	58	35	56	1,088	0,587 - 2,016	0,789
Frecuencias alélicas							
C	56	24	34	27	0,84	0,50 – 1,42	0,495
T	180	76	92	73			

rs2283792 (MAPK1)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
TT	11	9	6	10	0,977	0,343 – 2,778	0,965
GT	57	48	27	43	1,246	0,673 – 2,307	0,484
GG	50	43	30	47	0,809	0,437 – 1,496	0,498
Frecuencias alélicas							
T	79	33	39	31	1,12	0,69 – 1,84	0,626
G	157	67	87	69			

rs2293370 (CD80)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
TT	3	3	1	2	1,617	0,165 – 15,878	0,677
CT	23	19	14	22	0,847	0,401 – 1,791	0,664
CC	92	78	48	76	1,106	0,536 – 2,283	0,786
Frecuencias alélicas							
T	29	12	16	13	0,96	0,48 – 1,95	0,910
C	207	88	110	87			

rs2300603 (BAFT)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
CC	8	7	1	2	4,509	0,551 – 36,897	0,126
CT	49	41	24	38	1,154	0,617 – 2,159	0,654
TT	61	52	38	60	0,704	0,379 – 1,310	0,267
Frecuencias alélicas							
C	65	28	26	26	1,46	0,85 – 2,54	0,149
T	171	72	100	74			

rs2546890 (IL12B)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
AA	24	21	15	24	0,826	0,397 – 1,719	0,609
AG	61	52	30	48	1,198	0,649 – 2,212	0,563
GG	32	27	18	28	0,941	0,476 – 1,860	0,862
Frecuencias alélicas							
A	109	47	60	48	0,96	0,61 – 1,52	0,851
G	125	53	66	52			

rs3118470 (IL2RA)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
CC	13	11	4	6	1,826	0,570 – 5,855	0,305
CT	43	36	20	32	1,233	0,644 – 2,360	0,528
TT	62	53	39	62	0,681	0,365 – 1,271	0,227
Frecuencias alélicas							
C	69	29	28	22	1,45	0,85 – 2,47	0,151
T	167	71	98	78			

rs4410871 (MYC)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
TT	11	9	4	6	1,516	0,462 – 4,973	0,490
CT	40	34	27	43	0,684	0,365 – 1,281	0,234
CC	67	57	32	51	1,273	0,689 – 2,351	0,441
Frecuencias alélicas							
T	62	26	35	28	0,93	0,55 – 1,55	0,758
C	174	74	91	72			

rs4613763 (PTGER4)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
CC	1	1	1	2	0,530	0,033 – 8,618	0,650
CT	22	19	8	13	1,576	0,657 – 3,777	0,305
TT	95	80	54	85	0,688	0,297 – 1,594	0,382
Frecuencias alélicas							
C	24	10	10	8	1,31	0,58 – 3,06	0,488
T	212	90	116	92			

rs4648356 (TNFRSF14)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
AA	10	8	3	5	1,852	0,491 – 6,990	0,357
AC	55	47	31	49	0,901	0,489 – 1,662	0,739
CC	53	45	29	46	0,956	0,517 – 1,766	0,886
Frecuencias alélicas							
A	75	32	37	29	1,12	0,68 – 1,85	0,636
C	161	68	89	71			

rs4902647 (ZFP36L1)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
CC	35	30	19	30	0,977	0,501 – 1,904	0,944
CT	60	51	34	54	0,882	0,478 – 1,629	0,689
TT	23	19	10	16	1,283	0,568 – 2,899	0,548
Frecuencias alélicas							
C	130	55	72	57	0,92	0,58 – 1,46	0,707
T	106	45	54	43			

rs669607 (Gen no conocido)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
TT	26	22	14	22	1	0,479 – 2,089	1
GT	59	51	30	48	1,119	0,606 – 2,066	0,719
GG	32	27	19	30	0,872	0,444 – 1,711	0,690
Frecuencias alélicas							
T	111	47	58	46	1,06	0,67 – 1,67	0,799
G	123	53	68	54			

rs7200786 (CLEC16A)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
AA	30	25	18	28	0,852	0,429 – 1,692	0,648
AG	60	51	30	48	1,138	0,617 - 2,099	0,679
GG	28	24	15	24	0,996	0,485 – 2,042	0,990
Frecuencias alélicas							
A	120	51	66	52	0,94	0,60 – 1,48	0,781
G	116	49	60	48			

rs7923837 (HHEX)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
AA	18	15	8	12	1,710	0,642 – 4,554	0,279
AG	41	35	30	46	0,586	0,314 – 1,092	0,091
GG	59	50	27	42	1,333	0,720 – 2,468	0,359
Frecuencias alélicas							
A	77	33	46	35	0,88	0,55 – 1,42	0,593
G	159	67	84	65			

rs8112449 (ICAM3)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
AA	6	5	6	10	0,509	0,157 - 1,649	0,253
AG	50	42	28	44	0,919	0,496 – 1,703	0,789
GG	62	53	29	46	1,298	0,703 – 2,397	0,404
Frecuencias alélicas							
A	62	26	40	32	0,77	0,46 – 1,27	0,270
G	174	74	86	68			

rs874628 (MPV17L2)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
CC	6	5	6	10	0,509	0,157 - 1,649	0,253
CT	47	40	24	38	1,076	0,574 – 2,016	0,820
TT	65	55	33	52	1,115	0,604 – 2,059	0,728
Frecuencias alélicas							
C	59	25	36	29	0,83	0,50 – 1,39	0,462
T	177	75	90	71			

rs9282641 (CD86)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
AA	0	0	0	0			
AG	14	12	8	13	0,925	0,366 – 2,341	0,870
GG	104	78	55	77			
Frecuencias alélicas							
A	14	6	8	6	0,93	0,35 – 2,50	0,874
G	222	94	118	94			

rs949143 (ARL6IP4)	R		NR		OR	IC	p
	N	%	N	R			
Genotipos							
GG	8	7	4	6	1,073	0,310 – 3,711	0,912
AG	44	37	27	43	0,793	0,425 – 1,478	0,465
AA	66	56	32	51	1,230	0,666 – 2,270	0,509
Frecuencias alélicas							
G	60	25	35	28	0,89	0,53 – 1,49	0,628
A	176	75	91	72			